

Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço

# VITAMINA C E CANCRO

## ESTUDO EXPERIMENTAL

Tese de doutoramento em Engenharia Biomédica, orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pela Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Antunes Cruz Ribeiro e apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço

# VITAMINA C E CANCRO

Estudo experimental



Setembro 2016

## **CAPA**

Imagem de cristais de ácido ascórbico, forma reduzida da vitamina C, em luz polarizada. © Fotosearch.com



Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Engenharia Biomédica, orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pela Professora Doutora Ana Bela Sarmento Antunes Cruz Ribeiro, e apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, financiada por bolsa de investigação atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/75300/2010). Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos programas estratégicos PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013.



O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado no Instituto de Biofísica, no Laboratório de Oncobiologia e Hematologia, Unidade de Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia e no Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida – IBILI, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A análise histológica foi realizada no laboratório de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

O que foi, isso é o que há de ser;  
e o que se fez, isso se tornará a fazer;  
nada há novo debaixo do sol.

Eclesiastes 1:9



## PREFÁCIO

O avanço das técnicas de rastreio e das medidas de prevenção têm conduzido a um aumento da deteção de casos de cancro colorretal em fase precoce, casos esses em que os doentes são submetidos a tratamento com intenção curativa. Apesar destes esforços, muitos doentes são diagnosticados com doença em estágio avançado associada a pior prognóstico, o que posiciona o cancro colorretal como uma das principais causas de morte relacionadas com cancro em todo o mundo.

O stresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos na carcinogénese. Contudo, dependendo dos seus níveis pode induzir a morte das células tumorais, podendo ser utilizado na terapia do cancro. Durante os últimos anos, os efeitos pró-oxidantes e citotóxicos de elevadas concentrações de vitamina C nas células tumorais têm sido estudados em detalhe, tanto em culturas celulares como em modelos animais. Sabe-se também que as elevadas concentrações de vitamina C, imprescindíveis para a indução de efeitos citotóxicos, são facilmente atingíveis em humanos por via intravenosa. Em comparação com a maioria dos fármacos de quimioterapia, a vitamina C induz efeitos anti-tumorais moderados, contudo, com efeitos secundários ínfimos. Evidências biológicas e clínicas sugerem que o uso de concentrações elevadas de vitamina C poderão potenciar a eficácia da quimioterapia convencional. Deste modo, a possível sinergia proveniente desta combinação poderá diminuir os efeitos adversos induzidos pelos agentes terapêuticos. Por conseguinte, a redução da toxicidade poderá permitir aos doentes tolerar os tratamentos de quimioterapia, mantendo ou melhorando a sua eficácia.

Um longo caminho tem de ser percorrido até à implementação de regimes de



combinação com recurso ao uso de vitamina C, caminho esse que incluirá estudos de sinergia de fármacos, otimização de massas, tempos de exposição, protocolos de administração de cada um dos compostos, primeiramente num contexto pré-clínico e, posteriormente, numa fase de ensaios clínicos.

A escassez de estudos que avaliem o potencial da vitamina C no tratamento do cancro colorretal constituiu o motivo instigador para a concretização deste trabalho. Como primeira abordagem, este projeto incluiu o estudo do efeito citotóxico da vitamina C em três linhas celulares de cancro colorretal, com diferente perfil genético e diferente localização de origem do intestino. Perante a obtenção de resultados promissores decorrentes do uso de elevadas concentrações de vitamina C, os seus mecanismos de ação foram estudados, verificando-se que a vitamina C atua por vias distintas nas diferentes linhas celulares, mas com potencial terapêutico em todas elas. Numa segunda abordagem, o trabalho teve continuidade com o estudo do efeito da terapia combinada de vitamina C com três fármacos integrantes dos regimes de quimioterapia convencional usados no tratamento do cancro colorretal. Evidências de sinergia permitiram a prossecução para os estudos *in vivo*.

O trabalho de investigação conducente ao presente documento não teria sido exequível sem a colaboração de uma vasta equipa, a quem as palavras que se seguem não serão suficientes para agradecer.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Professora Catedrática desta Faculdade, orientadora deste trabalho, agradeço por me ter acolhido uma vez mais no seu grupo de investigação, por todo apoio, pela experiência profissional partilhada no seu dia-a-dia, pelo rigor científico e pela revisão minuciosa deste manuscrito. A sua disponibilidade para ajudar perante qualquer circunstância, a sua dedicação diária no cumprimento dos grandes e dos pequenos desafios e a sua calma extrema na resolução de problemas, têm sido para mim uma fonte de inspiração e um exemplo a seguir.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço a coorientação, o apoio

demonstrado, o olhar crítico e a revisão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Crespo, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço pela sua paixão contagiante pelo tema e por ter sido o fomentador da minha candidatura à bolsa de doutoramento, a qual culminou na concretização deste documento.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que me tem acompanhado desde os meus primeiros passos na área da ciência, agradeço o constante apoio, a confiança, a capacidade de gestão de recursos, a dedicação e o empenho diários que tanto me têm servido de exemplo e de motivação nesta caminhada profissional. E como a sua influência na minha vida vai muito além do âmbito profissional, agradeço a amizade, a compreensão, os conselhos, e o exemplo de amor ao próximo, que diariamente a faz estar atenta às necessidades de quem a rodeia. Por tudo isto e muito mais, obrigado!

À Doutora Mafalda Laranjo, agradeço a colaboração na realização de algumas das experiências apresentadas neste trabalho, a partilha de conhecimento científico, o rigor profissional que a caracteriza e a disponibilidade constante. Obrigado pelo acompanhamento diário e pela amizade que desejo que perdurem.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves, agradeço a colaboração no trabalho laboratorial, nomeadamente nas técnicas de citometria de fluxo e de microscopia ótica, o profissionalismo e os ensinamentos.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, em especial ao Dr. Rui Caetano Oliveira pela disponibilidade e pelo empenho em me ajudar na análise histológica.

Aos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço pela cedência dos citostáticos utilizados neste trabalho.

À Mestre Raquel Marques, agradeço pela cooperação no trabalho laboratorial, pela boa disposição que sempre emanou e pela amizade que ainda hoje prezo por manter. Ao Mestre João Encarnação, agradeço pela ajuda inestimável em todo o

percurso em que a par trabalhámos, pelo exemplo de dedicação, pelo apoio e amizade indescritíveis. A eles, que vi crescer na ciência, desejo o maior sucesso quer a nível profissional como pessoal.

À Mestre Ana Catarina Mamede, a minha companheira de alegrias e de tristezas, de sorrisos e de lágrimas. Obrigado pelos ensinamentos, pela garra e entrega, pela persistência e determinação, que hoje a colocam onde está. Agradeço a amizade que a distância não dissolverá.

Ao Mestre João Casalta, agradeço pela valiosa colaboração na análise estatística dos resultados e na aplicação do modelo de combinação de fármacos, e pela simpatia continuamente demonstrada.

À Doutora Ana Brito que trilhou na Engenharia Biomédica os mesmos passos que eu, agradeço pela preocupação constante mesmo que distante, pela partilha e debate de questões científicas e pela amizade. Ao Doutor Fernando Mendes agradeço pela boa disposição infundável e pelos minutos que, do seu dia atarefado, sempre dedica a perguntar se está tudo bem. Às Doutoras Maria João Carvalho e Sara Ferreira e aos Mestres Telmo Gonçalves, Ricardo Teixeira e Rita Roxo, obrigado por toda a ajuda demonstrada e incentivos constantes.

Às Mestres Vanessa Silva e Raquel Alves, aos Licenciados António Almeida, Gustavo Santos, Renata Amaral, Stéphanie Fernandes, Adriana Mamede e Inês Marques, agradeço porque em algum momento deste percurso, estiveram na bancada colaborando para este trabalho experimental. Aos restantes alunos aqui não nomeados, obrigado por contribuírem para um ambiente de trabalho saudável no Instituto de Biofísica.

À Cláudia Caridade, secretária do Instituto de Biofísica, que nos tem seguido ao longo dos anos de etapa em etapa, presto a minha gratidão pela diligência diária no seu trabalho e pela disponibilidade contínua.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia agradeço pelo suporte financeiro individual com a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/75300/2010), e pelo financiamento de parte deste trabalho laboratorial através dos programas estratégicos

PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013.

Aos meus amigos e à minha família, obrigado pelo carinho e pela motivação que me ajudaram a percorrer este caminho.

Aos meus Pais, a quem devo o esforço de uma vida para que eu pudesse ter a oportunidade de subir este degrau, agradeço pelo auxílio, pela preocupação e pela motivação incessantes. Aos meus irmãos e respectivas famílias, obrigado pelo encorajamento contínuo, por aturarem a minha presença e sentirem a minha ausência.

Ao Tiago, que desde o início me apoiou, que celebrou comigo as vitórias, que me fez levantar das frustrações, agradeço a paciência, os conselhos e os incentivos diários. À Eva que diariamente me faz sorrir, rir e gargalhar. Obrigado por tornarem mais fácil o que seria difícil.

A Deus, quem tudo é e a quem tudo devo.





## RESUMO

O cancro colorretal é o terceiro tipo de cancro mais incidente e representa 9,7% da incidência de cancro em todo o mundo. A taxa de mortalidade tem diminuído, principalmente nos países ocidentais, devido aos programas de rastreio e consequente deteção da doença em estádios precoces, assim como, à disponibilidade de terapias mais eficazes. A quimioterapia mantém-se uma das principais opções terapêuticas contra esta neoplasia. No entanto, esta modalidade de tratamento convencional mostra-se muitas vezes insuficientemente eficaz e altamente associada a efeitos adversos limitantes da prossecução dos tratamentos.

O potencial da vitamina C na terapia do cancro há muito que tem sido avaliado, pelas suas propriedades pró-oxidantes e pelo seu potencial em reduzir os efeitos adversos relacionados com o tratamento do cancro. Dada a polarização de corrente de pensamento entre o ceticismo relativo à eficácia terapêutica de concentrações farmacológicas de vitamina C e as evidências altamente sugestivas dos seus efeitos benéficos no tratamento do cancro, há uma necessidade eminente de conhecimento dos mecanismos específicos pelos quais a vitamina C atua contra a célula tumoral.

Atuais revisões sistemáticas têm sugerido uma reduzida robustez dos estudos pré-clínicos e dos ensaios clínicos realizados com concentrações farmacológicas de vitamina C. Esta é a razão que motivou a realização deste trabalho experimental, cujo objetivo é avaliar o potencial da vitamina C, na forma de ácido ascórbico (AA), no tratamento do cancro colorretal. A citotoxicidade da vitamina C em três linhas celulares humanas de cancro colorretal, com diferentes perfis genéticos, foi avaliada e o seu mecanismo anti-tumoral foi estudado. Para tal, inúmeras técnicas de biologia celular e

molecular foram utilizadas, entre elas, o ensaio da sulforrodamina B, a citometria de fluxo, a microscopia ótica, o *western blot*, a marcação radioativa e os estudos de influxo. Adicionalmente, pretendeu-se averiguar o efeito quimiossensibilizante da vitamina C *in vitro*, com a implementação de um modelo de combinação de fármacos baseado num desenho experimental em raio. O modelo animal heterotópico de cancro colorretal foi desenvolvido para avaliação do potencial terapêutico e sinérgico da vitamina C *in vivo*.

Os estudos de citotoxicidade mostraram que o ácido ascórbico induziu efeitos anti-proliferativos, citotóxicos e genotóxicos nas três linhas celulares de cancro colorretal. As vias de morte ativadas pelo ácido ascórbico foram dependentes da sensibilidade das linhas celulares ao stresse oxidativo e da intensidade do estímulo oxidativo. O ácido ascórbico foi igualmente capaz de induzir morte celular por um mecanismo independente de espécies reativas de oxigénio, de caspases e da proteína P53. Elevadas concentrações de ácido ascórbico permitiram ainda reverter a quimiorresistência da linha celular LS1034.

O modelo de combinação de fármacos mostrou que concentrações elevadas de ácido ascórbico sensibilizam a célula de cancro colorretal ao efeito do 5-FU, da oxaliplatina e do irinotecano. Os efeitos anti-proliferativos mais notórios ocorreram quando o ácido ascórbico estava presente em maior proporção. A combinação de ácido ascórbico com oxaliplatina revelou ser a mais promissora, facto corroborado pelos resultados dos estudos *in vivo*. Os estudos *in vivo* mostraram ainda que concentrações farmacológicas de ácido ascórbico inibiram o crescimento de xenotransplantes de cancro colorretal e potenciaram os efeitos citotóxicos da oxaliplatina e do irinotecano.

Este trabalho de investigação fundamental reforça o potencial da vitamina C no tratamento do cancro colorretal. De facto, concentrações farmacológicas deste nutriente medeiam diferentes mecanismos de ativação de morte da célula tumoral e sensibilizam-na para o efeito da quimioterapia. Este conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de ação da vitamina C e a expectável rigorosa avaliação da sua eficácia clínica poderão contribuir para o estabelecimento de protocolos de tratamento mais eficazes, economicamente sustentáveis, de baixa toxicidade e que contribuam para a melhoria da qualidade de vida do doente oncológico.

## **ABSTRACT**

Colorectal cancer is the third most frequent type of cancer worldwide, representing an incidence of 9.7%. The mortality rate has decreased, especially in Western countries due to screening programs implementation and the subsequent detection of the disease in early stages, as well as the availability of more effective therapies. However, chemotherapy remains a major therapeutic option against this type of cancer. This conventional treatment modality often displays insufficient effectiveness and highly adverse effects limiting the pursuit of treatments.

The potential of vitamin C in cancer therapy has long been evaluated by its pro-oxidant properties and its potential to reduce the adverse effects related to the cancer treatment. Given the division of opinions between the skepticism around the therapeutic efficacy of pharmacological concentrations of vitamin C and the highly suggestive evidence of their beneficial effects in the treatment of cancer, there is an imminent need for knowledge of the specific mechanisms by which vitamin C acts against tumor cell.

Current systematic reviews have suggested a reduced robustness of preclinical studies and clinical trials with pharmacologic concentrations of vitamin C. This is the reason that motivated this experimental study, which aims to assess the potential of vitamin C, in the form of ascorbic acid (AA), for the treatment of colorectal cancer. The cytotoxicity of vitamin C in three human colorectal cancer cell lines, with different genetic profiles, was evaluated and its antitumor mechanism was studied. For this purpose, several cellular and molecular biology techniques have been used, such as sulforhodamine B assay, flow cytometry, light microscopy, western blot analysis, radioactive labeling and influx studies. In addition, it sought to determine the

chemosensitive effect of vitamin C *in vitro*, with the implementation of a model of drugs combination based on a ray experimental design. The heterotopic animal model of colorectal cancer has been developed for evaluation of therapeutic and synergistic potential of vitamin C *in vivo*.

Cytotoxicity studies showed that ascorbic acid induces anti-proliferative, cytotoxic and genotoxic effects in cells of the three cell lines of colorectal cancer. The cell death pathways activated by ascorbic acid are dependent on the sensitivity of cell lines to oxidative stress and oxidative stimulus intensity. Ascorbic acid is also capable of inducing cell death through a mechanism independent of reactive oxygen species, caspases and P53. High concentration of ascorbic acid also allowed to reverse the chemoresistance of LS1034 cell line.

The model of drugs combination showed that high concentrations of ascorbic acid sensitize the colorectal cancer cell to the effects of 5-FU, oxaliplatin and irinotecan. The most notorious anti-proliferative effects were observed when ascorbic acid is present in greater proportion. The combination of ascorbic acid and oxaliplatin was shown to be the most promising combination, fact corroborated by the results of *in vivo* studies. *In vivo* studies have shown that pharmacological concentrations of ascorbate inhibit the growth of colorectal cancer xenografts and potentiate the cytotoxic effects of oxaliplatin and irinotecan.

This fundamental research work reinforces the potential of vitamin C in the treatment of colorectal cancer. In fact, pharmacological concentrations of this nutrient mediate different mechanisms of tumor cell death activation and sensitize it to the effect of chemotherapy. This deeper understanding of vitamin C mechanisms of action and the expected rigorous evaluation of its clinical effectiveness may contribute to the establishment of more effective treatment protocols, economically sustainable, with low toxicity and that contribute to the improvement of cancer patient's quality of life.

# ÍNDICE

Prefácio .....	IX
Resumo .....	XV
Abstract .....	XVII
Índice .....	XIX
Parte I - Contextualização teórica .....	25
Capítulo I - O cancro colorretal .....	27
Cancro colorretal.....	28
Fatores de risco e carcinogénese.....	29
Diagnóstico e estadiamento .....	33
Opções terapêuticas .....	36
5-Fluorouracilo.....	39
Oxaliplatina .....	42
Irinotecano .....	45
Capítulo II – A vitamina C e o cancro .....	49
Vitamina C .....	50
Características bioquímicas .....	50
Fontes alimentares.....	51
Farmacocinética.....	53
Funções bioquímicas e biológicas.....	61
Cofator de enzimas .....	62



Cofator no sistema HIF .....	64
Absorção de ferro .....	65
Antioxidante.....	66
Pró-oxidante.....	68
A vitamina C no tratamento do cancro.....	71
Primeiras descobertas e controvérsias.....	71
Avanços na investigação pré-clínica.....	72
Mecanismos de ação .....	74
Mecanismos extracelulares para a ação da vitamina C.....	74
Mecanismos intracelulares para a ação da vitamina C.....	81
Avanços recentes na investigação clínica .....	83
Vitamina C e a terapêutica convencional do cancro .....	86
Capítulo III – Objetivos.....	91
Parte II - Trabalho experimental .....	93
Capítulo IV – Vitamina C e seu mecanismo anti-tumoral.....	95
Materiais e métodos.....	95
Cultura das linhas celulares.....	96
Tratamento com ácido ascórbico.....	97
Citotoxicidade do ácido ascórbico .....	99
Análise da proliferação celular pelo ensaio SRB.....	99
Análise da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico .....	100
Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo .....	101
Análise da viabilidade e mecanismos de morte celular .....	102
Análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo e microscopia ótica .....	103
Análise da expressão de BAX e BCL-2 por citometria de fluxo.....	105

Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo .....	106
Análise da expressão de caspase-8 e -9 por western blot .....	107
Análise das lesões no DNA pelo ensaio cometa .....	109
Análise do stresse oxidativo por citometria de fluxo e pelo ensaio SRB .....	111
Análise da expressão de P53 por western blot.....	115
Análise da expressão de VEGF-R1 por citometria de fluxo.....	115
Análise da expressão de PGP por citometria de fluxo.....	116
Estudos de farmacocinética.....	117
Expressão dos transportadores de vitamina C.....	117
Estudos de influxo com <sup>99m</sup> Tc-AA.....	119
Análise estatística .....	122
Resultados .....	123
Citotoxicidade do ácido ascórbico .....	123
Proliferação celular.....	123
Sobrevivência celular.....	125
Ciclo celular .....	126
Viabilidade e mecanismos de morte celular .....	128
Viabilidade e morte celulares .....	128
Expressão de BAX e BCL-2.....	131
Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ).....	132
Expressão de caspase-8 e caspase-9 .....	134
Genotoxicidade .....	136
Stresse oxidativo .....	138
Expressão de P53 .....	145
Expressão de VEGF-R1 .....	146

Expressão de PGP.....	147
Estudos de farmacocinética.....	147
Discussão.....	153
Citotoxicidade do ácido ascórbico .....	154
Estudos de farmacocinética.....	174
Capítulo V – Vitamina C e seu efeito quimiossensibilizante.....	183
Materiais e métodos.....	184
Estudos <i>in vitro</i> .....	184
Avaliação da proliferação celular pelo ensaio SRB.....	185
Análise do ciclo, viabilidade e morte celulares .....	189
Estudos <i>in vivo</i> .....	189
Desenvolvimento do modelo xenotransplante.....	190
Tratamento .....	191
Análise histológica .....	193
Análise estatística .....	193
Resultados .....	194
Estudos <i>in vitro</i> .....	194
Proliferação celular.....	195
Ciclo, viabilidade e morte celulares.....	199
Estudos <i>in vivo</i> .....	214
Discussão .....	220
Estudos <i>in vitro</i> .....	221
Estudos <i>in vivo</i> .....	239
Parte III - Conclusões e perspectivas futuras .....	247
Parte IV - Referências bibliográficas .....	253

Parte V - Símbolos, abreviaturas e fórmulas.....	279
Parte VI - Anexos .....	287
Parte VII - Publicações relacionadas com a tese.....	301





PARTE I

CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA



## CAPÍTULO I - O CANCRO COLORRETAL

A palavra cancro é um termo genérico que engloba um conjunto de doenças que partilham características e não traduz uma única doença. Das características comuns podemos ressaltar o crescimento descontrolado e autónomo de células que sofreram alterações epigenéticas e genéticas, e que escaparam aos mecanismos de controlo (Gabriel, 2013; Cerqueira *et al*, 2015). Durante o processo de proliferação celular anormal, as células podem adquirir a capacidade de metastizar desde o seu local de origem, o tumor primário, até outros locais mais ou menos distantes (Hesketh, 2013).

O cancro é uma doença que mata milhares de pessoas anualmente em todo o mundo, sem fazer distinção de idade, género, etnia ou estatuto social e económico (Cerqueira *et al*, 2015). Embora as doenças cardiovasculares ainda ocupem o primeiro lugar como causa de morte a nível mundial, o cancro evidencia-se cada vez mais. Em 2012, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimou em 14,1 milhões o número de novos casos de cancro, em 8,2 milhões o número de mortes devido a cancro e em 32,6 milhões o número de pessoas a viverem com cancro (prevalência ao fim de 5 anos). A Europa contribui para este panorama com 23% da taxa de incidência, 24% da taxa de mortalidade e 30% da taxa de prevalência. A taxa geral de incidência de cancro para a Europa é cerca de 25% superior nos homens (205 em 100 000) em relação às mulheres (165 em 100 000). Em termos de mortalidade, as taxas são 15% superiores nos países mais desenvolvidos em relação aos países menos desenvolvidos quando se trata de mortalidade em homens e 8% superiores quando se trata de mulheres (Durko & Malecka-Panas, 2014; International Agency for Research on Cancer, 2016).

A nível mundial, dos vários tipos de cancro que compõem o cenário descrito e

esquematizado na Figura 1, o mais incidente é o cancro do pulmão (13%), seguido do cancro da mama (11,9%), do cancro colorretal (9,7%) e em quarto o cancro da próstata (7,8%). Apesar das taxas de mortalidade por tipos de cancro se alterarem em relação às taxas de incidência, o cancro do pulmão mantém-se em primeiro (19,4%), seguido do cancro do fígado (9,1%), do cancro do estômago (8,8%) e do cancro colorretal (8,5%) (International Agency for Research on Cancer, 2016).

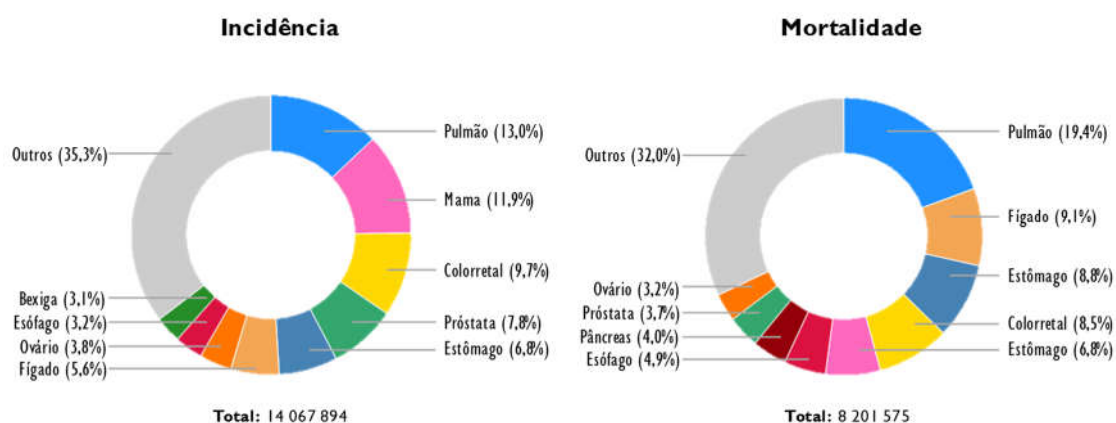


Figura 1: Estimativas de 2012 para a incidência e a mortalidade do cancro em todo o mundo. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimou 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes devido a cancro em 2012. O cancro colorretal representa 9,7% da incidência e 8,5% da mortalidade. Fonte: (International Agency for Research on Cancer, 2016).

## Cancro colorretal

Não obstante a ser o terceiro tipo de cancro com maior incidência e o quarto mais mortal em todo o mundo, na Europa o cancro colorretal ocupa outras posições no *ranking*, na medida em que é o segundo mais incidente (447 136 casos em 2012) e mais mortal (214 866 mortes em 2012) e o terceiro com maior taxa de prevalência aos 5 anos (1 203 943 casos em 2012). Ao contrário de muitas outras doenças malignas, o cancro colorretal é passível de ser prevenido e é mesmo potencialmente curável, se os adenomas de alto risco e os tumores em estádios precoces forem removidos. A sobrevivência a cinco anos dos doentes com cancro colorretal é aproximadamente 65% e altamente dependente do estágio do tumor no momento do diagnóstico (Gonzalez-

Pons & Cruz-Correa, 2015; International Agency for Research on Cancer, 2016). A taxa de sobrevivência, 5 anos após o diagnóstico, é de 90% para os doentes com doença localizada, de 70% para os que têm a doença em estádios com extensão regional e atinge os 13% nos doentes em estádios com disseminação à distância. Pelo facto do cancro colorretal ser normalmente assintomático até a sua progressão atingir estádios avançados, a implementação de programas de rastreio que visam a deteção precoce é essencial para a redução das taxas de incidência e de mortalidade (Gonzalez-Pons & Cruz-Correa, 2015).

### **Fatores de risco e carcinogénese**

É já sobejamente conhecido que o cancro colorretal é principalmente causado por estímulos ambientais e/ou adquiridos (da Costa Vieira *et al*, 2015). É de algum modo surpreendente que os fatores genéticos representem apenas 5% dos diferentes tipos de cancro, enquanto os fatores ambientais representem 95% (Encarnação *et al*, 2015). Os fatores de risco do cancro colorretal incluem a idade, a história familiar, a presença de doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês *inflammatory bowel diseases*), como a colite ulcerosa ou a doença de *Crohn*, e fatores ambientais como a dieta, o estilo de vida, o consumo de álcool, o tabagismo ou o sedentarismo, entre outros. Neste contexto, estudos epidemiológicos demonstram que mais de 40% dos doentes com colite desenvolvem cancro colorretal (Pan *et al*, 2011; Encarnação *et al*, 2015). Na tumorigénese do cólon, as células inflamatórias contribuem para o desenvolvimento de colite pela produção de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e de nitrogénio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*). O stresse oxidativo desempenha um papel preponderante no processo de carcinogénese visto que os seus alvos incluem o DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*), o RNA (do inglês *ribonucleic acid*), além de lípidos e de proteínas envolvidos na transformação maligna e na proliferação de células iniciadoras. De acordo com a literatura, a presença de inflamação crónica promove também o desenvolvimento de cancro já que proporciona um microambiente inflamatório durante a formação do tecido

tumoral. As citocinas e as quimiocinas inflamatórias e imunossupressoras, segregadas pelas células inflamatórias, promovem a proliferação, a angiogénese, a invasão e a consequente formação de metástases à distância, mas também suprimem o sistema imunitário o que, por sua vez, facilita o crescimento tumoral e, neste contexto, o desenvolvimento de cancro colorretal (Pan *et al*, 2011).

Os avanços a nível da biologia molecular nas últimas três décadas têm ajudado a desvendar alguns dos mecanismos moleculares e genéticos que estão na base da carcinogénese do cancro colorretal (Gonzalez-Pons & Cruz-Correa, 2015). Está bem estabelecido que a vasta maioria de adenocarcinomas colorretais derivam de lesões precursoras como os adenomas, os pólipos serrados ou como as síndromas hereditárias como a síndrome de Lynch e a polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*), entre outras (Fleming *et al*, 2012). No contexto das síndromas hereditárias, a carcinogénese colorretal é tradicionalmente dividida entre síndromas polipoide e não-polipoide. A síndrome não-polipoide mais comum é a síndrome de Lynch, enquanto a FAP é a síndrome polipoide mais comum (Dellaire *et al*, 2014).

Tal como referido anteriormente, cerca de 5% dos doentes com cancro colorretal têm uma verdadeira predisposição hereditária para o seu desenvolvimento, sendo mesmo possível, na maioria dos casos, identificar o evento genético responsável. No entanto, apesar de mais de 25% dos casos terem história familiar de cancro colorretal, os dados não são consistentes com nenhuma das síndromas hereditárias conhecidas. Porém, de um modo geral, podemos afirmar que a maioria dos casos de cancro colorretal são esporádicos, sem história familiar ou predisposição genética (Bogaert & Prenen, 2014).

O primeiro modelo de tumorigénese colorretal sugerido por Fearon e Vogelstein delineava uma via sequencial de quatro passos para o desenvolvimento do cancro. O primeiro passo comporta o desenvolvimento de adenoma pela inativação do gene APC (do inglês *adenomatous polyposis colis*), ao que se segue o segundo passo que inclui a promoção do crescimento adenomatoso promovido pelas mutações no gene KRAS (do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Após esta ocorrência segue-se a progressão tumoral devido às alterações genéticas no braço longo do cromossoma 18

(18q) e, posteriormente, a inativação da proteína P53, processo que origina o desenvolvimento do adenocarcinoma (Fearon & Vogelstein, 1990). Desta forma, este modelo evidenciou o papel desempenhado pelas alterações nos principais oncogenes, como por exemplo, o *KRAS*, o *NRAS* (do inglês *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), o *BRAF* (do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) e o *PIK3CA* (do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) e nos principais genes supressores tumorais como, por exemplo, o *APC*, o *TP53* e o *PTEN* (do inglês *phosphatase and tensin homolog*) na biologia do cancro colorretal (Figura 2) (Dienstmann et al, 2014).

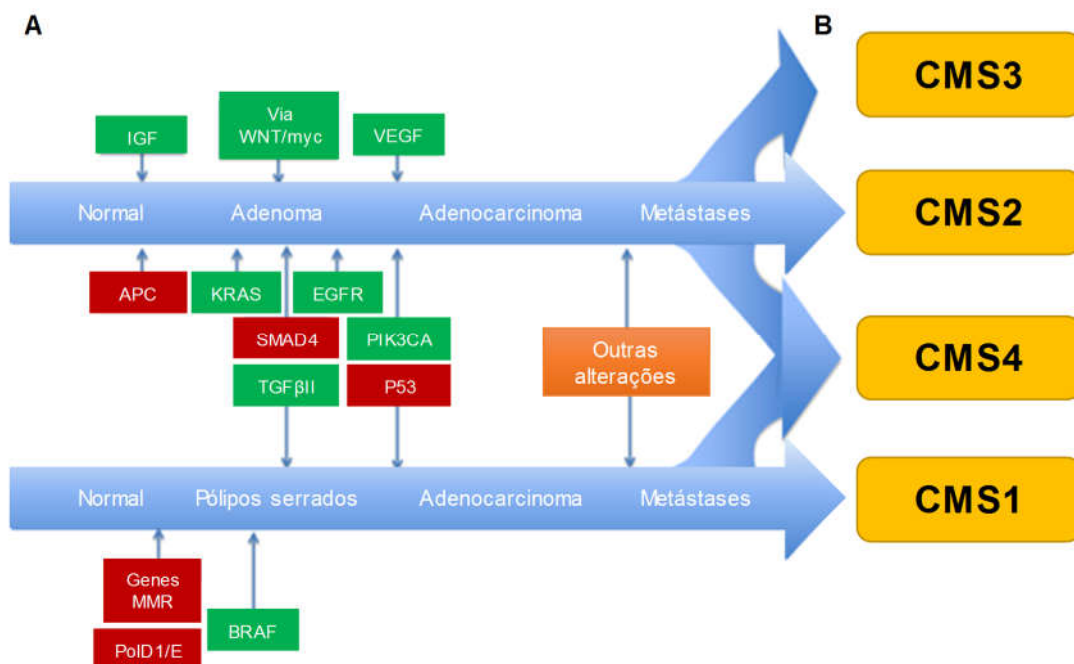


Figura 2: Modelos genéticos de cancro colorretal. (A) Os passos sequenciais da carcinogénese ocorrem como consequência de alterações moleculares em cada um dos modelos. (B) Os diferentes modelos moleculares estão na origem dos quatro subtipos de cancro colorretal (CMS, *consensus molecular subtypes*): CMS1 (MSI-imune, 14%), CMS2 (canónico, 37%), CMS3 (metabólico, 13%) e CMS4 (mesenquimatoso, 23%). Aos grupos representados acresce um grupo não classificável com características heterogéneas que representa 13% da amostra. Baseado em (Graham et al, 2016).

Apesar deste modelo ser genericamente aceite, conhecimentos recentes sugerem que esta sequência apenas ocorrerá em 60% dos casos o que conduziu à necessidade de rever o processo de patogénese do cancro colorretal (Kanthan et al,

2012). Tal como representado na Figura 2-A, outras vias têm sido implicadas no desenvolvimento do cancro colorretal, nomeadamente, as vias que envolvem o WNT/ $\beta$ -catenin, o TGF- $\beta$  (do inglês *transforming growth factor beta*), o EGFR (do inglês *epidermal growth factor receptor*), a subregulação da MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*) e a ativação da PI3K (do inglês *phosphoinositide 3-kinase*) (Dienstmann et al, 2014).

A carcinogénese é atualmente vista como um desequilíbrio entre o desenvolvimento de mutações e os mecanismos de controlo e, eventualmente, de reparação do ciclo celular. Este desequilíbrio toma o nome de “instabilidade genética” e é caracterizado pela codificação aberrante de genes. Atualmente, distinguem-se quatro mecanismos moleculares responsáveis pela instabilidade genética e epigenética que resultam na carcinogénese, a instabilidade cromossómica (CIN, do inglês *chromosomal instability*), a instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*), o fenótipo metilador das ilhas CpG (CIMP, do inglês *CpG island methylator phenotype*) e a hipometilação global do DNA (Kanthan et al, 2012; Maletzki et al, 2012; Gonzalez-Pons & Cruz-Correa, 2015; Yiu & Yiu, 2016). O progresso da investigação, alcançado a nível da expressão génica, tem permitido a classificação do cancro colorretal em vários subtipos. Contudo, as diferenças nas populações de doentes, nos métodos usados e na escolha de plataformas de expressão génica evidenciaram uma grande variabilidade nos subtipos encontrados pelos diferentes grupos de investigação. Para ultrapassar estas inconsistências foi criado o *Colorectal Cancer Subtyping Consortium* (CRCSC). Um extenso trabalho de colaboração permitiu a classificação do cancro colorretal em quatro CMSs (do inglês *consensus molecular subtypes*) com características moleculares distintas, designadamente o CMS1, o CMS2, o CMS3 e o CMS4 (Figura 2-B). Das amostras estudadas, 13% mantiveram-se de classificação indeterminada por constituírem padrões heterogéneos das diferentes CMS, contudo, não representam um quinto subtipo (Yiu & Yiu, 2016). Estas alterações citogenéticas constituem potenciais marcadores moleculares, tendo em conta que providenciam informação relativa ao diagnóstico, ao prognóstico e ao tratamento preditivo (Gonzalez-Pons & Cruz-Correa, 2015). As principais características dos quatro CMSs encontram-se sumariadas na Tabela I.



Tabela I: Características-chave dos quatro subtipos do cancro colorretal.

<b>Subtipo</b>	<b>Percentagem da amostra estudada</b>	<b>Características</b>
<b>CMS1 (MSI-imune)</b>	14%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caracterizado por MSI, CIMP elevado, hipermutação, mutações BRAF, expressão aumentada de genes relacionados com infiltração imune difusa, reduzido SCNAs.</li> <li>- Inclui a maioria dos carcinomas MSI com sobre-expressão de proteínas reparadoras do DNA e deficiente capacidade de reparação das lesões no DNA.</li> <li>- Frequentemente encontrado em tumores do cólon direito com elevado grau histológico em mulheres.</li> <li>- Relacionado com pior prognóstico após recidiva.</li> </ul>
<b>CMS2 (canónico)</b>	37%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevada frequência de SCNAs, indicadora de elevada CIN.</li> <li>- O maior número de ganhos no número de cópias em oncogenes e perdas no número de cópias em genes supressores tumorais em comparação com os restantes subtipos.</li> <li>- Sobre-regulação da via WNT e MYC.</li> <li>- Encontrado principalmente em tumores do cólon esquerdo.</li> <li>- Relacionado com maior sobrevivência após recidiva.</li> </ul>
<b>CMS3 (metabólico)</b>	13%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caracterizado por estado MSI misto, reduzidas SCNA e reduzido CIMP.</li> <li>- 30% das amostras eram hipermutadas e com sobreposição de MSI.</li> <li>- Mutações KRAS e desregulação metabólica.</li> </ul>
<b>CMS4 (mesenquimatoso)</b>	23%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caracterizado por elevado SCNA e consequente CIN, infiltração do estroma, ativação TGF-<math>\beta</math>, angiogénese e sobre-regulação da EMT.</li> <li>- Associados a tumores normalmente diagnosticados nos estádios III e IV e a pior sobrevivência global e pior sobrevivência pós-recidiva livre de doença.</li> </ul>
<b>Indeterminado</b>	13%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Subtipo com características mistas.</li> <li>- Caracterizado por fenótipo de transição e heterogeneidade tumoral.</li> </ul>

Baseado em (Graham *et al*, 2016; Yiu & Yiu, 2016). Abreviaturas: MSI – instabilidade de microssatélites; CIMP – fenótipo metilador de ilhas CpG; SCNAs – alterações no número de cópias somáticas (do inglês *somatic copy number alterations*); CIN – instabilidade cromossómica, EMT – transição epitélio-mesênquima (do inglês *epithelial-to-mesenchymal transition*).

## Diagnóstico e estadiamento

O curso de crescimento lento do cancro colorretal, desde a formação de um pólipo pré-cancerígeno até ao cancro invasivo, providencia oportunidade única para a

prevenção e para o diagnóstico precoce desta neoplasia. O rastreio é, por isso, essencial na redução da mortalidade por cancro colorretal pois aumenta o diagnóstico em estádios precoces e de lesões pré-neoplásicas, o que determina um aumento da probabilidade de sobrevivência. Os testes que são mais propensos à deteção de pólipos adenomatosos e de cancro incluem a retossigmoidoscopia flexível, a colonoscopia, a colonoscopia virtual e a pesquisa de sangue oculto nas fezes (Siegel & Jemal, 2014).

O estadiamento do tumor representa o fator de prognóstico mais importante para doentes com cancro colorretal. Existem vários sistemas para estadiamento do cancro colorretal, incluindo as classificações de *Dukes*, *MAC* (*Modified Astler-Coller classification*) e *TNM* (acrónimo de *tumor node metastasis*). Todos estes sistemas têm em conta a invasão pelo tumor das camadas da parede do cólon, dos órgãos na proximidade e de órgãos à distância (Young *et al*, 2011). Destes, a classificação *TNM* é o sistema de estadiamento mais comumente utilizado e mais consistente, sendo fruto da avaliação de membros de várias entidades, nomeadamente, da *American Joint Committee on Cancer* (*AJCC*), da *Union for International Cancer Control* (*UICC*) e do *TNM Prognostic Factors Committee*. Este é baseado na profundidade da invasão da parede do intestino, na extensão do envolvimento dos gânglios linfáticos e na presença de locais de patologia à distância (metástases) (Wolpin & Mayer, 2008; Brenner *et al*, 2014; Dellaire *et al*, 2014). Tal como evidenciado em detalhe no Anexo I, Tabela 15, a profundidade da invasão tumoral define o estágio T, a revisão dos gânglios linfáticos circundantes define as categorias do estágio N e a propagação do tumor para além do intestino e dos gânglios linfáticos regionais define o estágio M (Wolpin & Mayer, 2008).

Os três critérios que estabelecem a classificação *TNM*, a invasão do tumor, o envolvimento dos gânglios linfáticos e a presença de metastização, permitem categorizar globalmente o cancro colorretal em 5 estádios, ilustrados na Figura 3, com correspondência ao significado prognóstico (Tabela 2) (Dellaire *et al*, 2014).

A expressão de P53, de KRAS, de BCL-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2 protein*), de TGF- $\alpha$  (do inglês *transforming growth factor alpha*) e de EGFR, assim como o índice de proliferação e a presença de aneuploidias mantêm-se como alvo de estudo pelo seu valor de prognóstico isolado ou combinado em condições de alto risco (Labianca *et al*, 2013).

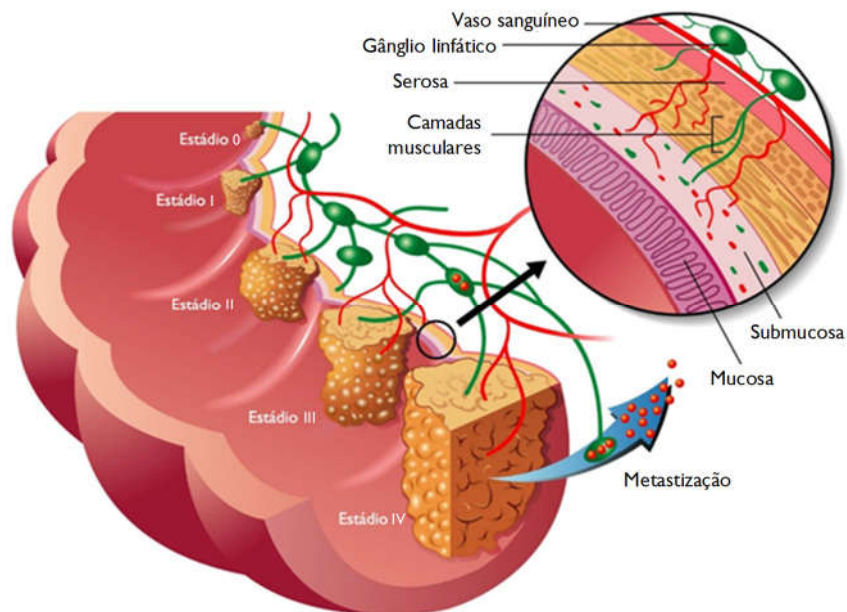


Figura 3: Estadiamento do cancro colorretal. No estágio 0 (não ilustrado na figura) o tumor ainda não atingiu a *muscularis mucosae* da parede do intestino; no estágio I o tumor já invadiu várias camadas da parede muscular do cólon; no estágio II o tumor penetrou completamente a parede do cólon e pode ter invadido tecidos circundantes; no estágio III o tumor propagou-se para os gânglios linfáticos regionais; e no estágio IV o tumor apresenta metástases para outros órgãos. Adaptado de <http://www.singaporemedicalclinic.com/ckfinder/userfiles/images/Colon%20Cancer%20Stages.jpg>.

No momento do diagnóstico, e referido à classificação TNM e às estatísticas do *Cancer Research UK* no Reino Unido, cerca de 14,6% dos doentes com cancro colorretal apresentam-se no estágio I, 22,2% no estágio II, 23,7% no estágio III e 21,7% no estágio IV (UK, 2015). De ressaltar que parte dos doentes em estágio III podem evoluir para estágio IV se a doença não for controlada. O fígado é normalmente o primeiro local de metastização, mas a propagação da doença para outros órgãos como os pulmões, o peritoneu e os gânglios linfáticos intra-abdominais é também comum. Em termos de abordagens terapêuticas, os doentes com um número reduzido de metástases, desde que confinadas a um órgão, poderão ser tratados por resseção cirúrgica. Contudo, a maioria dos doentes com doença metastática são candidatos a quimioterapia sistémica, com carácter paliativo, para melhoria da qualidade de vida e eventual aumento do tempo de sobrevivência. Apesar dos avanços no tratamento do cancro colorretal, as taxas de sobrevivência cinco anos após o diagnóstico para os doentes com cancro colorretal avançado permanecem baixas. À medida que o estágio segundo o sistema TNM aumenta,

a sobrevivência aos cinco anos declina dramaticamente. Assim, a sobrevivência é superior a 90% para os doentes diagnosticados no estágio I, varia de 70 a 85% para os doentes no estágio II, de 25 a 85% para os doentes no estágio III e é inferior a 10% para os doentes no estágio IV (Wolpin & Mayer, 2008; Marques *et al*, 2014).

Tabela 2: Estadiamento anatómico e sua relação com os vários grupos de prognóstico.

Estádio	T	N	M	DUKES	MAC
<b>0</b>	Tis	N0	M0	--	--
<b>I</b>	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
<b>IIA</b>	T3	N0	M0	B	B2
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0	B	B2
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0	B	B3
<b>IIIA</b>	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
<b>IVA</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1a	--	--
<b>IVB</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1b	--	--

Adaptado de (Labianca *et al*, 2013; Cancer, 2015). Abreviaturas: T – tumor primário; N – gânglios linfáticos regionais; M – metástases à distância; MAC – *modified Astler-Coller classification*.

## Opções terapêuticas

As decisões terapêuticas são tomadas considerando as melhores opções disponíveis de acordo com o estadiamento do cancro colorretal e com os benefícios e os riscos associados a cada uma das abordagens (Siegel & Jemal, 2014).

Aproximadamente 80% dos novos casos diagnosticados requerem tratamento cirúrgico, pois é considerada a abordagem de eleição com intuito curativo. O tratamento cirúrgico do cancro colorretal pode ser precedido de um tratamento neoadjuvante e/ou complementado por um tratamento adjuvante (Young *et al*, 2011).

No que diz respeito à quimioterapia, o protocolo quimioterapêutico depende do estadiamento do cancro colorretal mas também de outros fatores como, por exemplo, a idade ou as comorbidades de que o doente padece (Brenner *et al*, 2014).

O cancro colorretal no estágio 0 é normalmente tratado com recurso apenas à cirurgia, com excisão local ou polipectomia simples. No estágio I a opção terapêutica inclui a ressecção cirúrgica, mas usualmente, sem recurso à quimioterapia adjuvante. No caso de cancro colorretal no estágio II, o tratamento cirúrgico inclui a ressecção do segmento do cólon afetado e adequada linfadenectomia loco-regional. Nestes casos, a abordagem terapêutica pode incluir a quimioterapia adjuvante em doentes que apresentem pelo menos um dos seguintes fatores de pior prognóstico ou de recidiva, nomeadamente, menos de 12 gânglios linfáticos removidos, tumores pouco diferenciados, existência de invasão vascular, linfática ou perineural, oclusão intestinal ou estágio T4 na classificação TNM. O mesmo tratamento cirúrgico é realizado nos tumores no estágio III. Nestes casos o tratamento cirúrgico pode ser associado a quimioterapia neoadjuvante e/ou adjuvante que pode incluir o uso de oxaliplatina e uma fluoropirimidina. Nos cancros no estágio IV, os doentes são tratados com regimes de quimioterapia convencional de primeira e de segunda linha (Labianca *et al*, 2013; Brenner *et al*, 2014; Society, 2016). Neste caso, a abordagem cirúrgica depende da resposta ao tratamento neoadjuvante. Nos casos em que se verificou uma eficácia do tratamento neoadjuvante, o tratamento cirúrgico envolve a remoção do segmento intestinal afetado associado a linfadenectomia loco-regional adequada, assim como a ressecção de metástases em outros órgãos, como no fígado ou no pulmão. Nos casos em que o tratamento neoadjuvante não foi eficaz ou não pôde ser efetuado, o tratamento cirúrgico torna-se paliativo e tem como intuito a prevenção ou o tratamento de complicações associadas ao cancro colorretal, como a oclusão intestinal ou a hemorragia digestiva. A quimioterapia, a radioterapia ou tratamentos biologicamente direcionados poderão ser prescritos isoladamente ou em combinação para aliviar os sintomas e prolongar a sobrevivência do doente, principalmente nos casos em que se verifica a presença de metástases à distância irressuscáveis (Brenner *et al*, 2014; Siegel & Jemal, 2014; Society, 2016). É de referir ainda que, atualmente, a quimiorradioterapia neoadjuvante da

resseção cirúrgica é o tratamento *gold standard* no caso dos cânceros do reto cujo estadiamento pré-operatório revelou tratar-se de um tumor T3 ou qualquer tumor com adenopatias por metástases loco-regionais (Tamas *et al*, 2015).

As opções quimioterapêuticas convencionais incluem essencialmente fluoropirimidinas, oxaliplatina e irinotecano. A primeira linha de tratamento consiste na administração de uma fluoropirimidina, como o 5-fluorouracilo (5-FU) por via intravenosa ou outras fluoropirimidinas orais, em várias combinações e regimes terapêuticos. As combinações quimioterapêuticas de 5-FU, de leucovorina (LV) e de oxaliplatina (FOLFOX4) ou de 5-FU, de LV e de irinotecano (FOLFIRI) providenciam taxas de resposta mais elevadas, aumento do período de tempo com ausência de progressão de doença e maior sobrevivência em comparação com a combinação 5-FU/LV. A combinação FOLFOX4 é considerada a melhor opção para tratamento de primeira linha, enquanto a combinação FOLFIRI a opção mais plausível para tratamento de segunda linha (Oostendorp *et al*, 2010; Young *et al*, 2011; Labianca *et al*, 2013). A combinação de capecitabina com oxaliplatina (XELOX ou CapeOX) também é usada como alternativa ao FOLFOX4. Como a capecitabina é administrada por via oral, o XELOX constituiu uma opção preferencial para alguns doentes (Labianca *et al*, 2013).

Grandes avanços têm sido alcançados no tratamento quimioterapêutico do cancro colorretal, incluindo o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, de inibidores do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), como o bevacizumab, ou do EGFR, como o cetuximab ou o panitumumab, ou inibidores de cinases, como o regorafenib. Dada a impossibilidade de prever o tipo de resposta a estas terapias, tipicamente, todos os doentes recebem um *cocktail* que inclui todos estes agentes, à exceção dos inibidores de EGFR que são contra-indicados em doentes que possuam mutação no gene *KRAS*. A utilização destes regimes de combinação em doentes com doença metastática permitiu o aumento da sobrevivência global média deste grupo, permitindo inclusivamente a abordagem cirúrgica com resseção de metástases hepáticas que, previamente à quimioterapia, tinham sido caracterizadas como irressecáveis (Catenacci *et al*, 2011; Brenner *et al*, 2014).

## 5-Fluorouracilo

O 5-FU pode ser considerado um derivado da pirimidina que atua através da inibição da enzima timidilato sintetase (TS, do inglês *thymidylate synthase*) e é administrado por via intravenosa em bólus ou por infusão (Young *et al*, 2011). Esta fluoropirimidina é usada diariamente na prática da oncologia clínica há mais de 50 anos, tendo sido estabelecida uma boa correlação entre as concentrações de 5-FU no plasma e os seus efeitos biológicos. Estudos clínicos conduzidos durante os últimos 20 anos demonstraram que a gestão farmacocinética da concentração plasmática de 5-FU reduziu a toxicidade e aumentou a eficácia clínica. Estes estudos farmacocinéticos identificaram um intervalo terapêutico ideal para o 5-FU, recomendando algoritmos de ajuste de massa de modo a manterem as concentrações plasmáticas na gama ótima (Saif *et al*, 2009; Catenacci *et al*, 2011). Embora o 5-FU em combinação com outros agentes quimioterapêuticos incremente as taxas de resposta e de sobrevivência em doentes com cancro da mama e do pescoço, é no cancro colorretal que este fármaco tem demonstrado mais impacto (Grem, 1997; Zhang *et al*, 2008). Contudo, a taxa de resposta dos doentes com cancro colorretal avançado sujeitos a quimioterapia de primeira linha com 5-FU é apenas de 10 a 15%, aumentando para os 40 a 50% quando em combinação com o irinotecano ou com a oxaliplatina. Ainda assim, novas estratégias terapêuticas são urgentemente necessárias em especial quando o cancro se torna quimiorresistente. Por esta razão, o conhecimento dos mecanismos pelos quais o 5-FU induz morte celular e dos mecanismos envolvidos na sua quimiorresistência são passos imprescindíveis para uma melhor abordagem terapêutica (Longley *et al*, 2003).

O 5-FU é um análogo do uracilo, com um átomo de flúor que se liga ao carbono da posição 5 em lugar do átomo de hidrogénio (Figura 4). É metabolizado como o uracilo e entra rapidamente na célula por difusão facilitada. Para exercer a sua atividade citotóxica, o 5-FU tem de ser metabolicamente ativado por fosforilases e por cinases celulares. Após entrar na célula, o 5-FU é inicialmente convertido em vários metabolitos ativos: o FdUMP (do inglês *fluorodeoxyuridine monophosphate*), o FdUTP (do inglês *fluorodeoxyuridine triphosphate*) e o FUTP (do inglês *fluorouridine triphosphate*) (Figura 5). Estes metabolitos, uma vez incorporados no RNA e no DNA, são responsáveis pelo

efeito anti-cancerígeno do 5-FU (Longley *et al*, 2003; Matuo *et al*, 2010). Em maior detalhe, a incorporação de FUTP no RNA é acompanhada por efeitos lesivos a nível da síntese, da estabilidade, do processamento e da metilação do RNA. Por outro lado, o FdUTP pode ser incorporado no DNA levando à inibição da sua elongação assim como à sua fragmentação. Apesar destes efeitos inibitórios, o efeito terapêutico do 5-FU é atribuído em maior escala à inibição da timidilato sintetase pelo FdUMP. A timidilato sintetase é uma enzima crucial na síntese de DNA, responsável pela metilação do dUMP (do inglês *deoxyuridine monophosphate*) com formação de dTMP (do inglês *deoxythymidine monophosphate*) (Kuilenburg, 2004). A inibição da timidilato sintetase resultará num desequilíbrio dos nucleótidos, com níveis diminuídos de dTMP e níveis aumentados de dUMP, perturbando a síntese e/ou a reparação de DNA, o que resulta em lesões letais para a célula (Zhang *et al*, 2008; Matuo *et al*, 2010). A citotoxicidade do 5-FU, como consequência dos mecanismos relacionados com o RNA ou com o DNA, depende da concentração de 5-FU e do tempo de exposição ao mesmo. De facto, estudos demonstraram que elevadas concentrações de 5-FU num curto tempo de exposição induzem toxicidade associada a lesões no RNA, enquanto exposições prolongadas a menores concentrações favorecem lesões diretas no DNA (Kuilenburg, 2004).

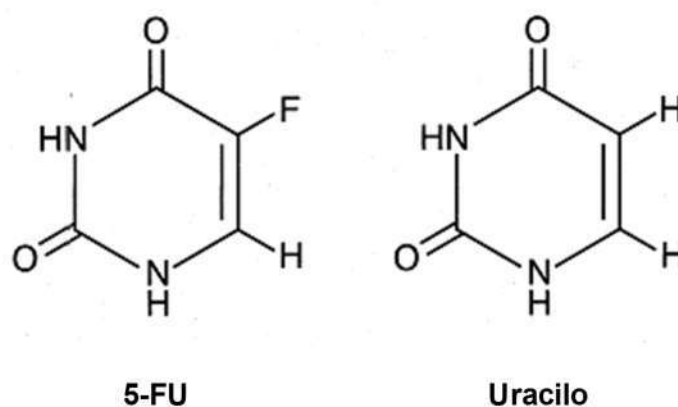


Figura 4: Estruturas do 5-FU e do uracilo. O 5-FU é um análogo do uracilo, com um átomo de flúor que se liga ao carbono da posição 5 em lugar do átomo de hidrogénio.

Embora os efeitos citotóxicos do 5-FU sejam provavelmente mediados diretamente pelas vias anabólicas, as vias catabólicas desempenham um papel significativo



tendo em conta que 80% do 5-FU é catabolizado pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD, do inglês *dihydropyrimidine dehydrogenase*). Tal como esquematizado na Figura 5 esta enzima, limitante da concentração de 5-FU, é responsável pela conversão do 5-FU em DHFU (do inglês *dihydrofluorouracil*). A atividade da DPD pode ser detetada em vários tecidos, contudo, o facto de estar abundantemente expressa no fígado faz com que este seja o principal órgão responsável pelo catabolismo do 5-FU (Longley *et al*, 2003; Kuilenburg, 2004). Existem amplas evidências que uma deficiência de DPD está associada com a toxicidade severa após administração do 5-FU. Doentes com deficiência parcial de DPD têm um risco aumentado de desenvolver neutropenia de grau IV, além de que os primeiros sintomas de toxicidade surgem mais rapidamente (cerca de duas vezes) comparativamente aos doentes com atividades normais daquela enzima (Kuilenburg, 2004).

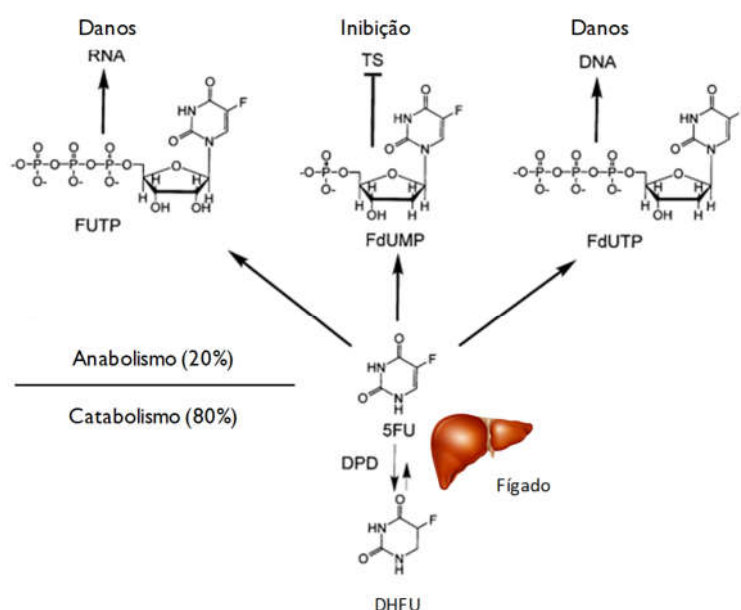


Figura 5: Metabolismo do 5-FU (5-fluorouracilo). Pela via anabólica o 5-FU é convertido em FUTP (fluorouridine triphosphate), em FdUMP (fluorodeoxyuridine monophosphate) e em FdUTP (fluorodeoxyuridine triphosphate) e induz lesões no RNA e/ou no DNA e a inibição da enzima TS (thymidylate synthase). No fígado, o catabolismo do 5-FU com formação de DHFU (dihydrofluorouracil) pela enzima DPD (dihydropyrimidine dehydrogenase) é o passo limitante de 5-FU. Adaptado de (Kuilenburg, 2004).

O 5-FU tem um índice terapêutico exíguo e uma forte correlação tem sido estabelecida entre a exposição a este fármaco e as toxicidades hematológica e

gastrointestinal. O padrão de toxicidade pode também variar de acordo com o regime de administração. Neste contexto, se a administração for por injeção em bólus a toxicidade limitante é a mielossupressão enquanto se a infusão for contínua a toxicidade gastrointestinal é proeminente (Codacci-Pisanelli *et al*, 1995). Assim, a toxicidade comumente relacionada com este fármaco inclui diarreia, eritema palmoplantar e estomatite. Em 2 a 5% dos doentes pode ocorrer espasmo da artéria coronária, com sintomas associados a *angor pectoris*. Com esta terapêutica, a alopecia não é comum (Kuilenburg, 2004; Young *et al*, 2011).

### **Oxaliplatina**

A oxaliplatina [oxalato-(trans-L-1,2-diaminociclohexano)platina(II); *Eloxatin*®] é um análogo de platina de segunda geração que se tem tornado num dos principais agentes quimioterapêuticos usado no tratamento do cancro colorretal nos estádios II, III ou metastizado. A oxaliplatina foi desenvolvida como uma opção que conferisse maior citotoxicidade tumoral e menos efeitos secundários do que a cisplatina (Woynarowski *et al*, 2000; Mehmood, 2014). O seu principal alvo, a nível celular, é o DNA onde, à semelhança da cisplatina e da carboplatina, forma ligações cruzadas entre as suas cadeias. Contudo, existem vários factos que fazem com que a oxaliplatina seja diferente de outros compostos de platina, nomeadamente: (1) o facto de ser unicamente indicada para cancro colorretal, uma neoplasia na qual a cisplatina não demonstra ter qualquer atividade anti-tumoral; (2) a sua interação sinérgica com as fluoropirimidinas, o que contrasta com a sua reduzida atividade quando presente isoladamente; (3) um perfil de toxicidade reduzida mas peculiar (Perego & Robert, 2016). Dadas estas características, este fármaco pode ser combinado com segurança com outros fármacos, como o 5-FU e o irinotecano, com aumento das taxas de resposta e de inibição da progressão tumoral (Kim *et al*, 2014; Mehmood, 2014). Embora a oxaliplatina possua um perfil de segurança melhor do que a cisplatina, ambos os fármacos estão associados a neurotoxicidade (Al Moundhri *et al*, 2013). Adicionalmente, os análogos de platina, tal como a oxaliplatina, têm demonstrado atividade anti-tumoral em linhas celulares com resistência adquirida à

cisplatina (Raymond *et al*, 2002).

A oxaliplatina é uma estrutura de platina, na qual o átomo de platina é complexado com o ligando transportador DACH (do inglês *1,2-diaminocyclohexane*), substituindo os grupos amina presentes na cisplatina (Figura 6). O papel crítico dos aductos DNA-platina como responsáveis pelos efeitos anti-proliferativos associados à cisplatina é aceito e pode ser extrapolado para todos os fármacos anti-tumorais derivados de platina. Contudo, a analogia entre a cisplatina e a oxaliplatina não deve ser sobrevalorizada. As diferenças entre os dois compostos em termos de atividade anti-tumoral e dos efeitos secundários permitem-nos inferir que os mecanismos de ação subjacentes poderão ser diferentes (Wojnarowski *et al*, 2000; Perego & Robert, 2016).

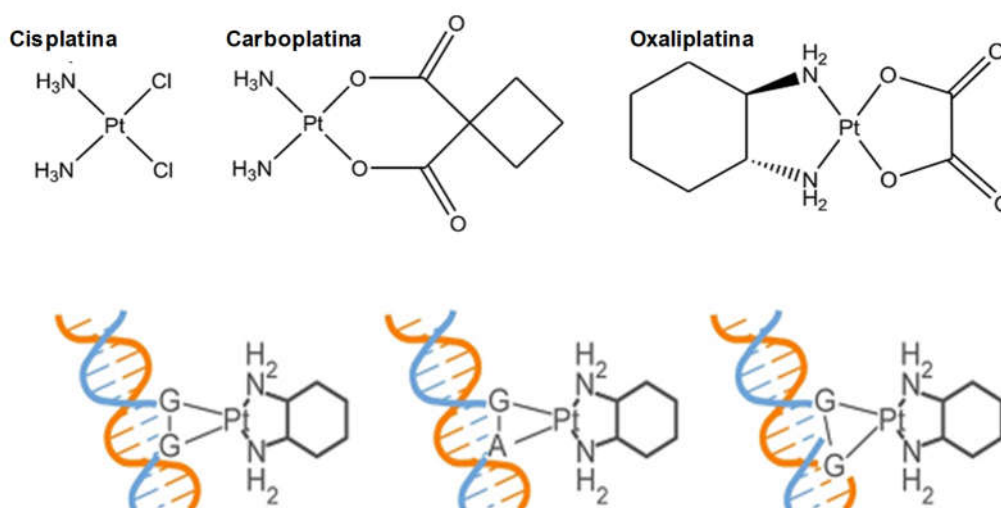


Figura 6: Oxaliplatina e seu mecanismo de ação. Em cima as estruturas químicas dos compostos derivados de platina clinicamente disponíveis (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina). Em baixo a representação esquemática da formação de adutos de oxaliplatina no DNA. Adaptado de (Kline & El-Deiry, 2013).

Vários anos depois da introdução da oxaliplatina, novos aspectos relativos à sua atividade têm sido descobertos a nível pré-clínico. O principal mecanismo anti-tumoral subjacente à ação da oxaliplatina foi descrito antes da aprovação para uso clínico no cancro colorretal, no entanto, novos mecanismos continuam a ser propostos (Perego & Robert, 2016). De uma forma geral e à semelhança da cisplatina, a oxaliplatina previne a replicação e a transcrição do DNA pela formação de aductos no mesmo (Young *et al*,

2011). A oxaliplatina sofre uma conversão enzimática em soluções fisiológicas originando derivados ativos através da ligação do ligando lábil oxalato. Assim, formam-se várias espécies reativas transitórias, as quais se ligam de forma covalente com macromoléculas. Ao ligar-se simultaneamente a duas bases de nucleótidos do DNA, a oxaliplatina forma ligações cruzadas entre as posições N7 de duas guaninas adjacentes (GG), de adeninas e guaninas adjacentes (AG) ou de guaninas separadas por outro nucleótido (GNG), o que determina a inibição da replicação e da transcrição do DNA (Grivicich *et al*, 2001; Mehmood, 2014). Para além deste mecanismo de ação, a oxaliplatina pode desencadear processos de morte celular por apoptose em células com deficiência no complexo de reparação incompatível (MMR, do inglês *mismatch repair complex*) do DNA, frequentemente presente no cancro colorretal, no qual a cisplatina falha na indução de apoptose (Raymond *et al*, 2002; Perego & Robert, 2016). Neste caso, a ligação covalente das enzimas de reparação do DNA com a oxaliplatina compromete a função das mesmas, de forma a que, se a lesão no DNA for substancial e irreparável, a célula é conduzida para morte celular por vias apoptóticas (Mehmood, 2014). Soube-se recentemente que a oxaliplatina é capaz de ativar a morte celular imunogénica (ICD, do inglês *immunogenic cell death*) em células tumorais pela translocação da calreticulina e outras chaperonas do retículo endoplasmático para a membrana celular. Estes eventos são capazes de desencadear uma resposta imunitária de combate às células tumorais pela captação de antígenos tumorais e modulação da função das células dendríticas (Perego & Robert, 2016).

A toxicidade associada ao uso de oxaliplatina, apesar de reduzida, está descrita. Realçam-se os efeitos secundários sobre o sistema hematopoiético causados essencialmente pela formação de aductos no DNA nas células progenitoras da medula óssea, causando mielotoxicidade com severidade dependente da concentração. Esta pode resultar em anemia hemolítica e em trombocitopenia que, usualmente, não são severas, assim como, a neutropenia, esta frequente em cerca de 4% dos doentes. Outro efeito secundário comum é a neurotoxicidade com neuropatia periférica, tanto aguda como crónica. A neuropatia periférica aguda aparenta estar relacionada com a massa total de fármaco administrada e com a duração da infusão, enquanto a neuropatia periférica crónica está associada à platina cumulativa. Esta última é normalmente

reversível 3 a 4 meses após o término do tratamento. A neuropatia periférica envolve essencialmente as fibras sensoriais e, em caso de ser aguda, manifesta-se como parestesia, disestesia e alodinia das extremidades, dos lábios e da oro e laringofaringe (Chabner & Longo, 2010; Mehmood, 2014).

Apesar das vantagens da oxaliplatina face à resistência das células tumorais à cisplatina, a sua atividade clínica é de alguma forma limitada. Com o intuito de melhorar a sua eficácia, a oxaliplatina é frequentemente usada em regimes de combinação. A farmacocinética e a farmacodinâmica da oxaliplatina adicionadas ao seu excelente perfil de segurança, com reduzida toxicidade hematológica em concentrações recomendadas e neurotoxicidade cumulativa relativamente tardia (mas geralmente reversível), tornam-na adequada para associação com outros compostos anti-tumorais (Raymond *et al*, 2002).

### **Irinotecano**

O irinotecano [7-etil-10-(4-(1-piperidino)-1-piperidino)carboniloxi-camptotecina; CPT-11; *Camptosar*®] é um análogo hidrossolúvel e semissintético da camptotecina, composto encontrado na *Camptotheca acuminata*, planta originária da China e do Tibete (Fuchs *et al*, 2006; Wagner, 2015). A camptotecina é um fármaco com atividade anti-tumoral testado em ensaios clínicos nos anos 70, contudo, a sua fraca solubilidade em água e o seu perfil de toxicidade imprevisível (diarreia, cistite, estomatite e mielossupressão) ditaram o fim do seu uso em contexto clínico. O interesse por este composto foi retomado nos anos 80 após a identificação do seu principal alvo molecular, a topoisomerase I. Esta descoberta motivou a síntese de análogos da camptotecina que preenchessem alguns critérios, nomeadamente, a hidrossolubilidade, o perfil de toxicidade favorável e a atividade anti-tumoral consistente. Entre outros, o irinotecano destacou-se pela sua atividade anti-tumoral nos cancros colorretal, gástrico, pancreático, cervical, pulmonar, assim como, na leucemia e no linfoma (Grivicich *et al*, 2001).

O irinotecano é um pró-fármaco que é espontaneamente convertido por

carboxilesterases endógenas no seu metabolito ativo, o SN-38, ambos representados na Figura 7. O SN-38 é posteriormente convertido no seu metabolito farmacologicamente inativo SN-38G (do inglês *SN-38 glucoronide*) por glicoronidação. Esta conversão é mediada pela enzima hepática UGT1A1 (do inglês *hepatic uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1*). O composto parental é eliminado por excreção biliar e o SN-38G por excreção renal (Fuchs *et al*, 2006; Wagner, 2015). Uma análise cuidada da atividade da UGT1A1 nos tecidos humanos normais demonstrou a existência de níveis elevados da mesma no fígado, no duodeno, no jejuno, no íleo, no cólon e no reto (Rothenberg, 2001; Sooryakumar *et al*, 2011). Para além destas localizações, tecido tumoral obtido a partir do cólon e do fígado tende a apresentar níveis de SN-38 mais baixos que o tecido normal correspondente e, conseqüentemente, menores níveis de atividade de carboxilesterases. É de realçar que níveis baixos de SN-38 no tumor contribuem, em larga escala, para a citotoxicidade do irinotecano tendo em conta que, ao contrário do fígado, os tumores não são capazes de o destoxificar por glicoronidação (Rothenberg, 2001).

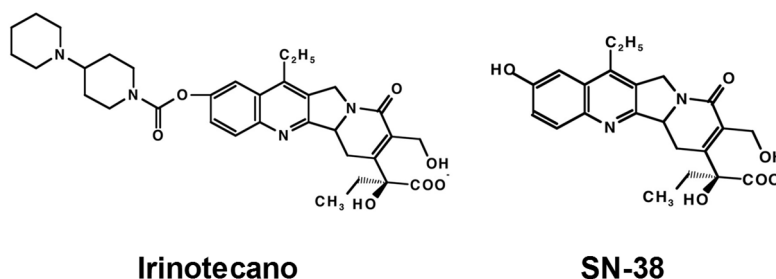


Figura 7: Estruturas do irinotecano e do SN-38. O irinotecano é um pró-fármaco que é espontaneamente convertido por carboxilesterases endógenas no seu metabolito ativo, o SN-38.

Quanto ao seu mecanismo de ação, o irinotecano é um ativo e potente inibidor da topoisomerase-I, enzima nuclear responsável pela manutenção da conformação tridimensional do DNA durante a replicação, assim como da transcrição do mesmo. Isto é, durante a replicação e a transcrição do DNA a topoisomerase-I cria uma quebra transitória de uma das cadeias de DNA, ligando-se de forma covalente à terminação 3'-fosforil da cadeia de DNA aberta. Pensa-se que o irinotecano e/ou o seu metabolito ativo SN-38 se liguem ao complexo DNA-topoisomerase-I e previnam a religação da

cadeia de DNA (Figura 8). A colisão do “garfo de replicação” com o complexo DNA-topoisomerase-I estabilizado resulta na quebra irreparável das duas cadeias do DNA, desencadeando a cascata apoptótica que culmina em morte celular (Grivicich et al, 2001; Fuchs et al, 2006).

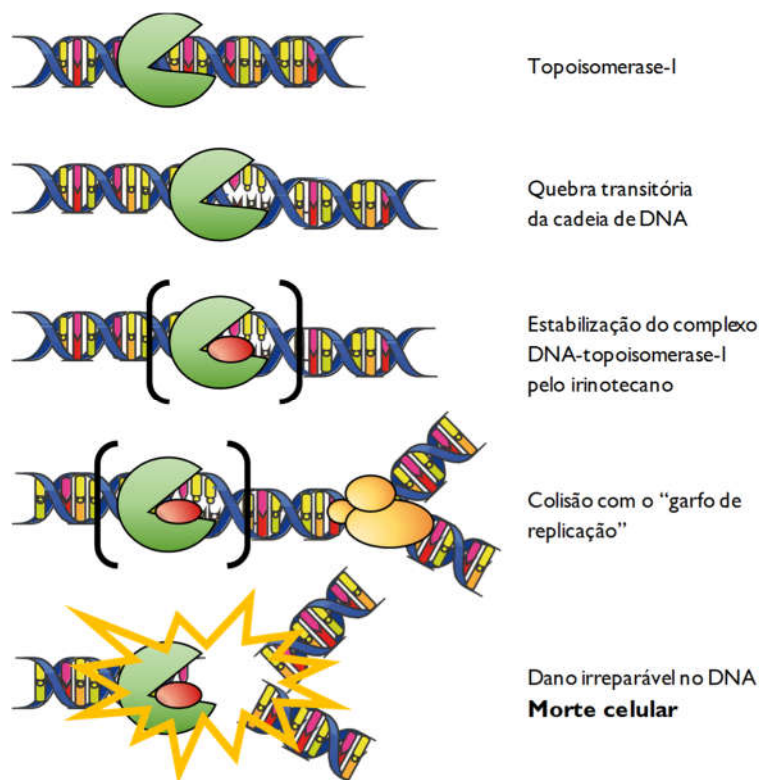


Figura 8: Irinotecano e seu mecanismo de ação. Representação esquemática da inibição da topoisomerase-I por ação do irinotecano. A topoisomerase-I cliva e desenrola o DNA como parte do processo de replicação e de transcrição. O SN-38 forma um complexo com o DNA e com a enzima, inibindo a religação da cadeia de DNA e bloqueando o movimento da polimerase de DNA ao longo do mesmo, processo que culmina em quebra das duas cadeias e consequente morte celular. Construído através de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Os principais efeitos secundários do irinotecano, limitativos do tratamento, são a diarreia e a neutropenia. O SN-38 pode causar diarreia como resultado direto de uma lesão entérica. Este facto deve-se à sua excreção biliar significativa, que faz com que se mantenha no trato gastrointestinal por longos períodos de tempo. Contudo, a toxicidade associada ao irinotecano é influenciada pela variabilidade genética da população. Por exemplo, a glicoronidação do SN-38 em SN-38G pela enzima UGT1A1

protege o trato gastrointestinal da toxicidade induzida pelo irinotecano. No entanto, doentes com reduzida atividade da enzima UGT1A1, como o caso de doentes com a síndrome de *Gilbert*, ou doentes com um polimorfismo na sequência TATAbox do gene *UGT1A1* que codifica a enzima UGT1A1 apresentarão um decréscimo do metabolismo do SN-38 e, conseqüentemente, terão suscetibilidade acrescida para as toxicidades gastrointestinal e hematológica (Fuchs *et al*, 2006).

O cancro colorretal avançado continua a ter mau prognóstico e o tratamento cirúrgico mantém-se como o que possui maiores potencialidades curativas nos doentes que se apresentam neste estágio. Contudo, as modalidades de tratamento convencionais continuam a ser insuficientemente eficazes. Um dos desafios presentes passa pelo estudo de novas oportunidades e de novas abordagens terapêuticas que permitam estabelecer novos protocolos ou combinações mais eficazes de fármacos. Contudo, um longo caminho tem de ser percorrido até à implementação de novos esquemas terapêuticos, caminho esse que inclua estudos de sinergia de fármacos, otimização de concentrações a administrar, tempos de exposição, protocolos de administração de cada um dos compostos, primeiramente num contexto pré-clínico e, posteriormente, em ensaios clínicos. A obtenção de sinergias irá contribuir para o planeamento de protocolos de tratamento mais eficazes contra o cancro colorretal, com massas reduzidas e efeitos adversos diminuídos.



## CAPÍTULO II – A VITAMINA C E O CANCRO

Cada vez mais o uso de compostos naturais tem sido considerado na prevenção e no tratamento do cancro. A aplicação intravenosa de elevadas concentrações de ácido ascórbico (AA), mais conhecido por vitamina C, tem sido usada desde os anos 70 para o tratamento do cancro (Venturelli *et al*, 2015). O seu potencial terapêutico tem sido suportado por um vasto e consistente conjunto de evidências resultantes de estudos *in vitro* (Riordan *et al*, 1995; Chen *et al*, 2005; Klingelhoefter *et al*, 2012; Kawada *et al*, 2013; Mastrangelo, 2013; Mastrangelo *et al*, 2013, 2015; Fukui *et al*, 2015), de estudos *in vivo* (Chen *et al*, 2007; Verrax & Calderon, 2009; Yeom *et al*, 2009; Espey *et al*, 2011; Serrano *et al*, 2015) e de evidências clínicas (Ohno *et al*, 2009; Monti *et al*, 2012; Welsh *et al*, 2013; Ma *et al*, 2014; Hoffer *et al*, 2015). O uso do AA num contexto clínico prende-se, essencialmente, na adoção de novas estratégias terapêuticas baseadas em regimes de combinação onde o AA desempenha um papel quimiossensibilizador. O seu efeito sinérgico com fármacos quimioterapêuticos convencionais, em vários tipos de cancro, é um facto já reportado por inúmeros autores, nomeadamente, no cancro do pâncreas (Espey *et al*, 2011), da próstata (Gilloteaux *et al*, 2014), da mama (Kurbacher *et al*, 1996) e do ovário (Ma *et al*, 2014). Estas evidências e a escassa literatura relativamente ao efeito anti-tumoral do AA no cancro colorretal realçam a necessidade de se estudarem os seus mecanismos de ação a nível da célula do cancro do cólon, assim como, o seu potencial quimiossensibilizador.

## Vitamina C

O valor de alguns alimentos na prevenção de doenças foi conhecido muito antes das primeiras vitaminas terem sido identificadas. Em 1912, o bioquímico britânico *Sir Frederick Hopkins* e o bioquímico polaco *Casimir Funk* propuseram a hipótese da correlação entre a doença e a deficiência de vitaminas, a qual postulava que a ausência de quantidades suficientes de uma determinada substância no sistema poderia levar a uma determinada doença. Parte desta hipótese ditava que o escorbuto era uma doença de deficiência alimentar causada pela falta de uma “substância hidrossolúvel desconhecida”. Em 1929, *Hopkins* é galardoado com o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina, pela descoberta de nutrientes essenciais à manutenção da saúde humana, hoje em dia conhecidos como vitaminas. A “substância hidrossolúvel desconhecida” de *Hopkins* e *Funk* agora denominada vitamina C tinha uma função assumida, a prevenção do escorbuto, mas composição química desconhecida (Hickey & Roberts, 2004; Zetterström, 2009). Em 1928, o bioquímico húngaro *Albert Szent-György* alterou esta realidade quando isolou um ácido do córtex da glândula adrenal e descobriu que se tratava de um potente agente redutor. Pela primeira vez *Szent-György* identificou a estrutura química da vitamina C, atribuindo-lhe o nome de ácido ascórbico (AA, Figura 9) (Svirbely & Szent-Györgyi, 1932, 1933).

### **Características bioquímicas**

A vitamina C (AA, ácido ascórbico) é uma lactona de seis carbonos com massa molecular de 176 g/mol. O facto de possuir dois grupos hidroxilo ionizáveis torna-a um dador de eletrões, propriedade responsável pela maioria das suas funções biológicas. A vitamina C tem dois valores de pKa, o pKa1 de 4,2 e o pKa2 de 11,6. Desta forma, o monoanião ascorbato (AA<sup>-</sup>), comumente designado por ascorbato, é a forma dominante a pH fisiológico. Como um excelente agente redutor, o ascorbato por oxidação é rapidamente convertido em radical ascorbil (AA<sup>•</sup>), o qual é rapidamente dismutado em ácido dehidroascórbico (DHA), tal como representado na Figura 9 (Du et al, 2012).

O AA puro é um pó cristalino branco, extremamente solúvel em água, originando uma solução incolor, ao invés do ascorbato de sódio que, por oxidar muito facilmente, contém frequentemente quantidades significativas de produtos de oxidação que lhe conferem uma cor amarela. A taxa de oxidação é dependente do pH e é acelerada por metais de transição. Na ausência de metais de transição e a pH 7, a oxidação espontânea do ascorbato é relativamente lenta. Esta auto-oxidação, isto é, oxidação na ausência de metais de transição, ocorre via dianião ascorbato ( $AA^{2-}$ , Figura 9). A pH 7 as espécies de vitamina C dominantes são o ascorbato (99,9%), o AA (0,1%) e o  $AA^{2-}$  (0,005%) (Du et al, 2012).

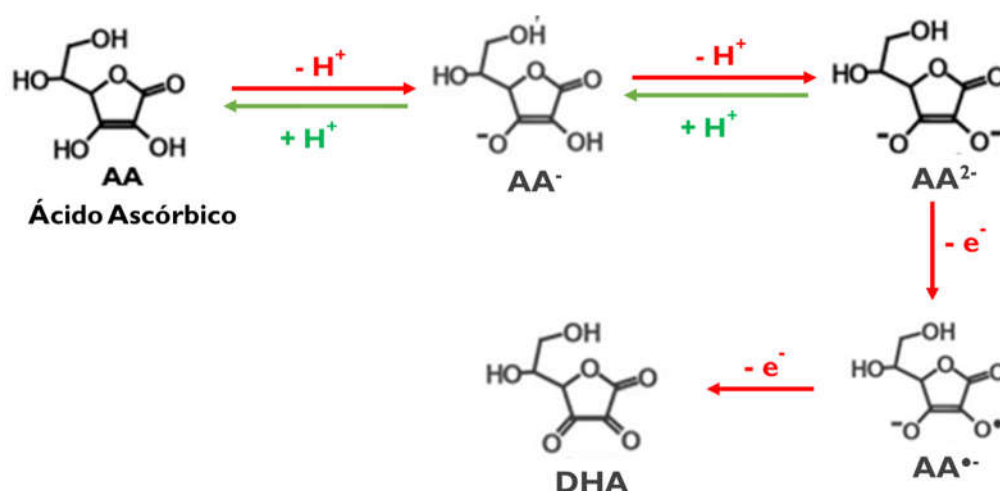


Figura 9: Estruturas das espécies químicas associadas à vitamina C. Legenda: AA, ácido ascórbico;  $AA^-$ , monoânion ascorbato;  $AA^{2-}$ , dianião ascorbato;  $AA^{\bullet-}$ , radical ascorbil; DHA, ácido dehidroascórbico (DHA).

### Fontes alimentares

A vitamina C é um micronutriente hidrossolúvel essencial à saúde humana. Os humanos são incapazes de sintetizar o AA devido a múltiplas mutações no gene que codifica a gulonolactona oxidase, a enzima terminal da via de biossíntese desta vitamina (Levine et al, 2005). Desta forma, as principais fontes de vitamina C para os humanos são a alimentação, os suplementos alimentares e os alimentos enriquecidos com ascorbato (Kumar et al, 2015).

A vitamina C é largamente encontrada em alimentos tanto de origem vegetal como animal, no entanto, as melhores fontes são as frutas e os vegetais frescos (Kumar *et al*, 2015). Este nutriente pode ser encontrado em citrinos, morangos, melão, manga, pimentos verdes e vermelhos, tomates, brócolos, couve de bruxelas, repolho, batata, ervilha, couve, couve-flor, nabo e outros vegetais folhosos. Peixe e leite também contêm pequenas quantidades de vitamina (Iqbal *et al*, 2004; Kumar *et al*, 2015). O teor de vitamina C nos alimentos pode ser diminuído pelo armazenamento prolongado e por algumas práticas de confeção. Provou-se que a fervura dos vegetais resulta na perda de 50 a 80% do teor em vitamina C. Cozinhar os alimentos a vapor com quantidades mínimas de água ou no micro-ondas diminui substancialmente a perda da vitamina C. A ingestão diária de 200 mg de vitamina C é facilmente obtida pelo consumo de cinco porções de frutas ou vegetais (Packer *et al*, 2002).

A vitamina C está incluída na maioria das formulações multivitamínicas na forma de AA, cuja biodisponibilidade é equivalente à de alimentos como o sumo de laranja, como o de maçã ou de uva, ou os brócolos (Levine, 1999; Packer *et al*, 2002). Outras formas de suplementos de vitamina C incluem o ascorbato de sódio, o ascorbato de cálcio, o AA com flavonoides ou outros produtos de combinação. Estudos em que a sua biodisponibilidade foi comparada com a dos alimentos também não mostraram diferenças significativas (Packer *et al*, 2002; Kumar *et al*, 2015).

Por último, alguns cereais e bebidas são enriquecidos com AA, um composto inodoro, branco e cristalino que é estável na sua forma liofilizada. A vitamina C é frequentemente adicionada a sumos de fruta, bebidas com sabor a fruta, sumos gaseificados, produtos à base de cereais e leite. A alguns sumos que normalmente não são uma fonte de vitamina C, como o sumo de maçã ou uva, a vitamina C é igualmente adicionada (Kumar *et al*, 2015).

No seguimento de um pedido da Comissão Europeia, o Painel NDA (do inglês, *Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies*) estabeleceu os valores de referência nutricionais (VRN) para a vitamina C, apresentando o respetivo artigo científico de opinião em 2013. O Painel definiu um valor médio para os VRN com um coeficiente de variação de 10%. Em indivíduos saudáveis, o valor médio é determinado pela quantidade

de vitamina C que equilibra as perdas de vitamina C pelo metabolismo e que garante a manutenção da concentração do ascorbato a nível plasmático em jejum por volta de 50  $\mu\text{mol/L}$ . Nos homens, o VRN médio proposto foi de 90 mg/dia enquanto nas mulheres foi de 80 mg/dia por extrapolação a partir do valor definido para os homens, tendo por base as diferenças da massa corporal de referência. A mesma extrapolação é feita para adolescentes e crianças, de forma que para rapazes entre os 15 e os 17 anos o VRN médio é 100 mg/dia enquanto para raparigas com a mesma idade o VRN médio é 90 mg/dia, e para crianças com idades entre 1 a 3 anos o VRN médio é 20 mg/dia. Para os bebés com 7 a 11 meses de idade os valores de referência de 20 mg/dia mantiveram-se iguais aos propostos anteriormente pelo Comité Científico para a Alimentação em 1993 (Efsa, 2013).

O consumo insuficiente de vitamina C causa escorbuto, o qual é caracterizado pela fraqueza generalizada do tecido conjuntivo, má cicatrização, hiperqueratose, sangramento das gengivas e perda de dentes devido à fragilidade dos tecidos ósseo e conjuntivo e dos capilares (Stephen & Utecht, 2001). Estes sintomas apenas aparecem se a ingestão de vitamina C for inferior a aproximadamente 10 mg/dia durante várias semanas. Apesar da deficiência em vitamina C não ser atualmente comum nos países desenvolvidos, pode surgir em pessoas cuja variedade alimentar é muito limitada (Kumar *et al*, 2015).

### **Farmacocinética**

A absorção, biodistribuição e transporte, metabolismo e eliminação da vitamina C é algo complexa e envolve vários mecanismos de transporte ativo e passivo, assim como, a sua redução intracelular o que permite a reciclagem da vitamina C em tecidos específicos (Lindblad *et al*, 2013).

Em humanos, a absorção de vitamina C ocorre na mucosa bucal, no estômago e no intestino delgado. A absorção bucal de vitamina C é mediada por difusão passiva através da membrana da cavidade bucal, enquanto a absorção gastrointestinal é feita

através de um eficiente mecanismo de transporte ativo dependente de sódio, energia e transportadores. Foi também descrito um mecanismo de absorção de vitamina C localizado no intestino com posterior reabsorção renal. Tendo em conta que a absorção deste micronutriente no intestino e nos rins atinge um ponto de saturação, a sua ingestão deve ser feita preferencialmente em pequenas e múltiplas quantidades ao longo do dia. Massas orais elevadas, acima de 180 mg, irão conduzir a um processo de saturação, o que determinará o aumento da excreção urinária e a diminuição da biodisponibilidade oral, sustentando o equilíbrio estacionário (Iqbal *et al*, 2004; Lindblad *et al*, 2013). Cerca de 80 a 90% do AA é absorvido no trato gastrointestinal e após a absorção circula livremente no plasma, dentro dos leucócitos e dos glóbulos vermelhos. Este entra em todos os tecidos atingindo concentrações plasmáticas máximas de 68 a 86  $\mu\text{mol/L}$  com uma ingestão oral de 90 a 150 mg/dia, as quais são consumidas pelo corpo humano em apenas duas horas. Três a quatro horas após a ingestão, o ascorbato ingerido já não é detetado na corrente sanguínea. A captação de vitamina C é ainda maior em condições de stresse, como o consumo de álcool ou de tabaco (Iqbal *et al*, 2004).

A maior parte da vitamina C existente nos alimentos está na forma reduzida, AA, (80 a 90%) e o restante na forma oxidada, DHA. O AA e o DHA são absorvidos por diferentes mecanismos de transporte em espécies animais que dependam da vitamina C dietética (Figura 10). Nas células de absorção do epitélio intestinal (os enterócitos), o DHA é enzimaticamente reduzido e acumulado sob a forma de AA, o qual é transportado através da membrana basolateral para a corrente sanguínea. Paralelamente à captação de vitamina C na bordadura em escova da membrana apical, o DHA proveniente da corrente sanguínea pode ser captado na membrana basolateral, reduzido a nível intracelular e retornar à circulação sanguínea na sua forma profícua e não tóxica, o AA. O sistema de transporte e o metabolismo intestinal visa a maximização da conservação da vitamina C e também a manutenção da mesma no seu estado reduzido não-tóxico, quer seja derivada da dieta ou da reciclagem da circulação sanguínea (Ball, 2004).

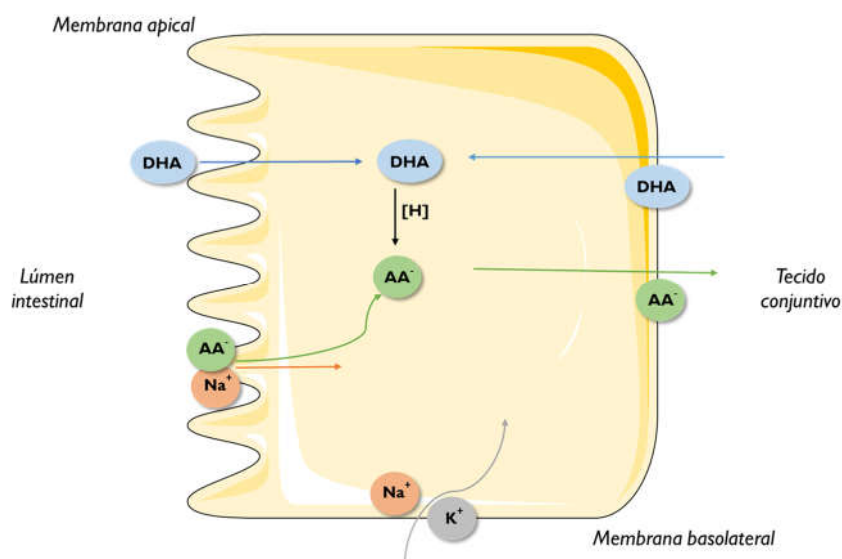


Figura 10: Modelo intestinal do transporte do monoânion ascorbato (AA<sup>-</sup>) e da molécula não carregada de DHA no enterócito. Construído através de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

A vitamina C após ingestão é absorvida no lúmen intestinal e amplamente distribuída pelo corpo humano, acumulando-se em alguns órgãos em concentrações na ordem do milimolar (Figura 11). As concentrações nos tecidos irão depender de todos estes processos. As concentrações de ascorbato nos tecidos variam muito com o tipo de tecido, encontrando-se maiores concentrações nas glândulas suprarrenais e na hipófise e menores no fígado, no baço, no pâncreas e nos rins. Posteriormente, a vitamina C é excretada por via renal e reabsorvida pelos sistemas tubulares (Packer *et al*, 2002; Levine *et al*, 2005; Lindblad *et al*, 2013). Assim, a estrita regulação da homeostase da vitamina C é primeiramente controlada por quatro sistemas reguladores: (1) captação intestinal (biodisponibilidade); (2) acumulação nos tecidos e distribuição; (3) taxa de utilização e reciclagem e (4) excreção renal e reabsorção tubular (Lindblad *et al*, 2013).

A ingestão de AA ou do seu metabolito reversivelmente oxidado, o DHA, aumenta a concentração plasmática de vitamina C em indivíduos humanos saudáveis. Os sistemas de transporte associados às membranas citoplasmáticas determinam a distribuição de vitamina C entre os fluidos extra e intracelulares (Wilson, 2005).

Ambas as formas da vitamina C, a forma reduzida (AA) e a forma oxidada (DHA), podem ser transportadas através da membrana plasmática, embora por transportadores distintos (Figura 12) (Figuroa-Méndez & Rivas-Arancibia, 2015).

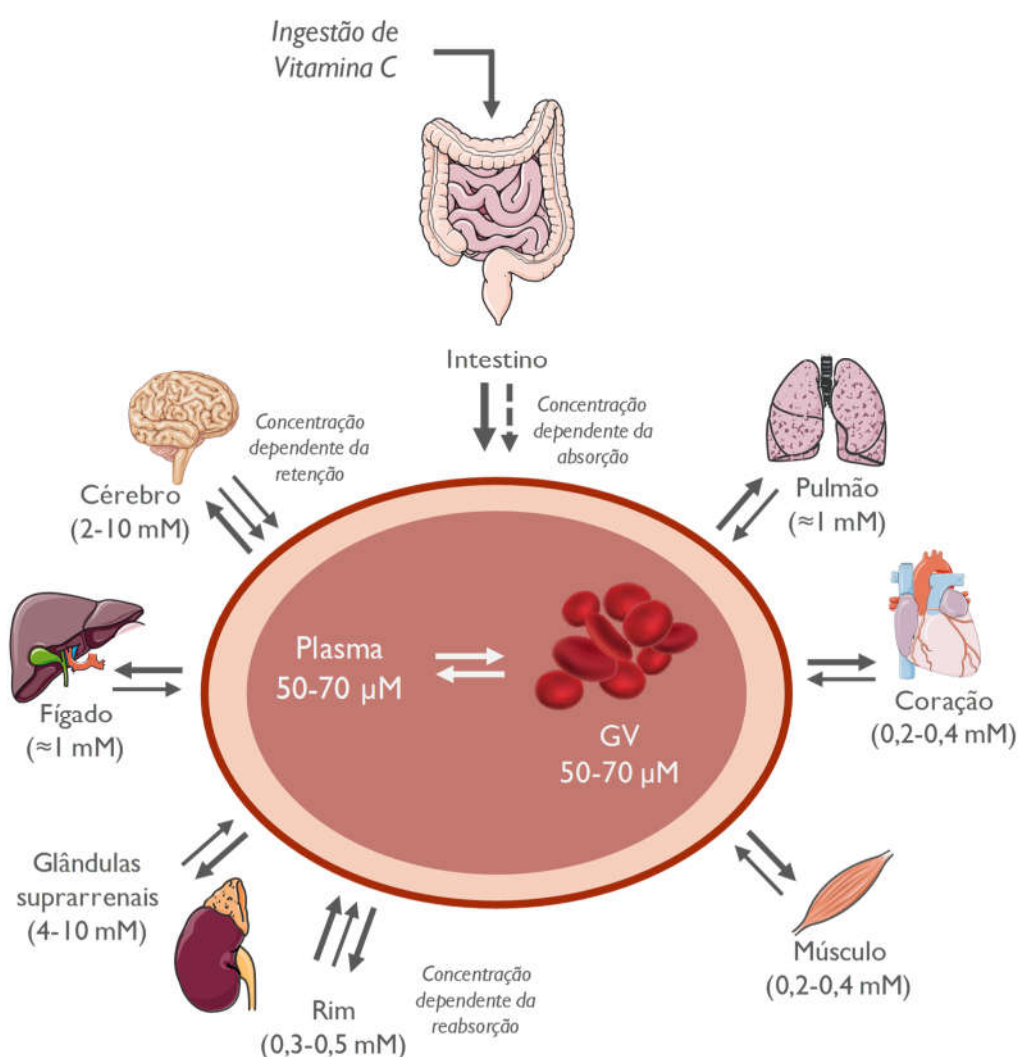


Figura 11: Biodistribuição da vitamina C. A vitamina C é ingerida, absorvida no lúmen intestinal e transportada pela corrente sanguínea para os diferentes órgãos, até que é excretada ou reabsorvida a nível do sistema renal. As concentrações de vitamina C nos tecidos são dependentes da captação intestinal, da sua acumulação e distribuição, e das taxas de utilização e excreção. GV: glóbulos vermelhos. Construído através de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

A difusão simples, a difusão facilitada e mecanismos ativos contribuem em larga escala para o transporte membranar de vitamina C. Moléculas igualmente hidrossolúveis, contudo mais pequenas e não ionizadas, como o etanol e o glicérol, difundem-se



rapidamente pelas membranas celulares através de vias inespecíficas, especialmente através da bicamada lipídica. Em contraste, o ascorbato não atravessa facilmente a bicamada lipídica devido ao seu tamanho, carga e baixa lipossolubilidade. A difusão simples do DHA é igualmente negligenciável, tendo em conta que o coeficiente de partição óleo:água do DHA é semelhante ao do manitol, o qual também não atravessa a bicamada lipídica. Assim, a difusão simples através da membrana plasmática a pH fisiológico compreende apenas um componente diminuto de acumulação da vitamina C, e pode ser considerado insignificante principalmente em células com sistemas de transporte com alta afinidade para o ascorbato ou para o DHA (Wilson, 2005).

O transporte de DHA ocorre por difusão facilitada, possibilitando o seu transporte a favor do gradiente de concentração. Este gradiente é mantido à medida que o DHA é reduzido em AA imediatamente após atravessar a membrana celular (Lindblad *et al*, 2013). O DHA pode ser internalizado por transportadores de glicose (GLUT, do inglês *glucose transporter*) e, posteriormente, reduzido em AA por diferentes sistemas enzimáticos (Savini *et al*, 2008). Foram já descritas 14 isoformas da proteína GLUT pertencentes à família dos transportadores de solutos (Figuroa-Méndez & Rivas-Arancibia, 2015). No entanto, neste grupo apenas o GLUT-1 e o GLUT-3, e em menor extensão o GLUT-4, se sabe que são capazes de transportar o DHA (Li & Schellhorn, 2007; Lindblad *et al*, 2013). Recentemente, Corpe e seus coautores demonstraram em enterócitos de rato que os transportadores GLUT-2 e GLUT-8 são igualmente capazes de internalizar o DHA (Corpe *et al*, 2013). Cada um destes transportadores tem as suas próprias características e específica distribuição pelos tecidos. O transporte de DHA via GLUTs é competitivamente inibido pela glicose. Por exemplo, o excesso de glicose no plasma ou no intestino bloqueará o local de ligação e, conseqüentemente, diminuirá o transporte facilitado de DHA. Esta associação é também observada na absorção de DHA em alguns tipos de células, enquanto que noutras a presença de glicose tem menor ou nenhum efeito no transporte de DHA (Lindblad *et al*, 2013). A isoforma GLUT-1 é amplamente expressa nas células eucariotas humanas. A sua presença nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica pode contribuir para a manutenção da concentração de ascorbato no cérebro. O GLUT-2 é principalmente expresso no fígado, no baço e na membrana basolateral dos enterócitos e das células do epitélio renal. O

GLUT-3 é um transportador de elevada afinidade que inicialmente se pensava estar presente apenas em neurónios, contudo, atualmente sabe-se que também está expresso em espermatozoides, embriões e leucócitos. O GLUT-4 é expresso nas células dos músculos esquelético e cardíaco, assim como, do tecido adiposo. Desta forma, o transporte do DHA é realizado por um mecanismo de difusão facilitada mediado por alguns GLUTs de forma independente de iões  $\text{Na}^+$  (Figueroa-Méndez & Rivas-Arancibia, 2015).

Tal como evidenciado na Figura 12, após captação pelo epitélio intestinal, a vitamina C é libertada na corrente sanguínea como AA, tendo em conta que mais de 95% da vitamina C presente no plasma humano está na forma reduzida. O AA é facilmente oxidado, produzindo DHA o qual, por sua vez, é captado pelo GLUT-1 dos eritrócitos. O AA resultante pode ser libertado na corrente sanguínea. Em condições de oxidação no espaço extracelular, o DHA produzido é absorvido pelas células circundantes e imediatamente reduzido (Lindblad *et al*, 2013). Este processo contínuo de oxidação-redução da vitamina C denomina-se de reciclagem e é imprescindível para a manutenção de baixas necessidades diárias desta vitamina (Rivas *et al*, 2008). Para além disso, permite também a manutenção dos níveis adequados de AA para a execução das suas funções, nomeadamente a manutenção do equilíbrio redox (Lindblad *et al*, 2013).

Reciprocamente, o AA é importado por um mecanismo ativo, requerendo a presença de transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCTs, do inglês *sodium-dependent vitamin C transporters*), nomeadamente o SVCT-1 e o SVCT-2 (Packer *et al*, 2002; Savini *et al*, 2008; Du *et al*, 2012). O SVCT-1 e o SVCT-2 foram clonados pela primeira vez em 1999 (Tsukaguchi *et al*, 1999) e são glicoproteínas de superfície codificadas por dois genes diferentes, mas muito semelhantes em estrutura, partilhando em 65% a sua identidade (Savini *et al*, 2008; Lindblad *et al*, 2013). Baseado nos valores de  $K_m$  (concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima), os SVCTs têm maior afinidade para o ascorbato que os GLUTs para o DHA, sendo assim considerados transportadores de vitamina C com elevada afinidade. Os SVCTs transportam através da membrana celular o AA às custas de um gradiente eletroquímico de sódio e, por essa razão, são classificados como transportadores ativos

secundários (Li & Schellhorn, 2007). Este sistema permite o transporte de ascorbato contra o gradiente de concentração, possibilitando a sua acumulação nas células em concentrações mais de cinquenta vezes superiores às dos fluidos extracelulares. Alguns estudos têm demonstrado que a dependência do sódio ( $\text{Na}^+$ ) está associada a uma estequiometria de dois íons  $\text{Na}^+$  para um anião ascorbato, com o gradiente de sódio a dirigir o transporte de AA, cuja manutenção é feita pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Levine *et al*, 2005; Lindblad *et al*, 2013). As distintas características funcionais e distribuição pelos tecidos do SVCT-1 e do SVCT-2 indicam que estes dois transportadores desempenham diferentes papéis fisiológicos. O SVCT-1 está envolvido na homeostase da vitamina C pelo corpo inteiro, enquanto o SVCT-2 protege células metabolicamente ativas do stresse oxidativo. A regulação dos seus níveis proteicos poderá servir para a acumulação preferencial do AA em locais de interesse (Savini *et al*, 2008). Além disso, está documentado que o transportador SVCT-1 é nove vezes mais rápido que o SVCT-2, enquanto que este último tem maior afinidade para o ascorbato, com um  $K_m$  de 21,3, o SVCT-1 tem um  $K_m$  de 252,0 (Figueroa-Méndez & Rivas-Arancibia, 2015). As propriedades diferentes destes dois transportadores são provavelmente a explicação da sua distribuição nos tecidos. O SVCT-1 é encontrado maioritariamente em tecidos epiteliais, por exemplo, no intestino delgado e no túbulo contornado proximal do nefrónio, onde o transporte de ascorbato é superior ao requerido pelas células. Este é considerado um transportador de baixa afinidade e de elevada capacidade, o que está de acordo com a sua função de manter a homeostase global. Por outro lado, o SVCT-2 é encontrado maioritariamente no cérebro, no músculo esquelético, na placenta e no olho, onde a contribuição do ascorbato é estritamente controlada para a manutenção de concentrações adequadas. Este é considerado um transportador de elevada afinidade e baixa capacidade, permitindo às células de órgãos periféricos captar o AA do fluido extracelular (Lindblad *et al*, 2013; Figueroa-Méndez & Rivas-Arancibia, 2015). O papel distinto desempenhado por estes dois transportadores na regulação das concentrações globais de vitamina C é suportado ainda pela sua localização (Lindblad *et al*, 2013). Estudos *in vitro* evidenciaram a expressão de SVCT-1 na membrana apical e de SVCT-2 na membrana basolateral de enterócitos e das células tubulares renais (Boyer *et al*, 2005; Varma *et al*, 2009), como evidenciado na Figura 12.

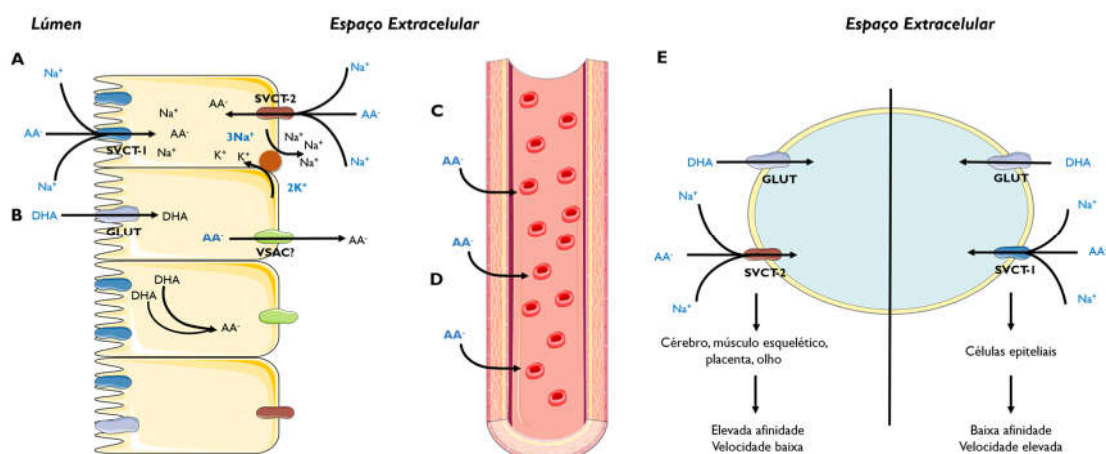


Figura 12: Mecanismos de influxo e efluxo da vitamina C. (A) O transporte de ascorbato para o enterócito ocorre por transporte ativo via SVCT-1, acoplado à bomba de sódio/potássio; (B) O DHA é transportado para o enterócito por difusão facilitada via GLUTs; (C) Sob condições restritas de ingestão de AA, o suprimento de ascorbato para a célula é feito através do SVCT-2 localizado na membrana basolateral, o qual é igualmente acoplado à bomba de sódio/potássio; (D) No interior do enterócito, o DHA é reduzido a ascorbato, o qual após sair do enterócito se difunde pela corrente sanguínea, atingindo o espaço extracelular; (E) O tipo de transportador SVCT presente em cada célula depende das características e necessidades da mesma. O SVCT-2 é frequente em tecido que requerem um suprimento contínuo de ascorbato, enquanto o SVCT-1 é mais frequente em células responsáveis pela distribuição do ascorbato pelos tecidos. Construído através de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

A biodisponibilidade, ou concentração efetiva, de AA é dependente da absorção intestinal e da excreção renal, sendo que no Homem a principal via de excreção do ascorbato é a urinária (Packer *et al*, 2002; Li & Schellhorn, 2007). A vitamina C, ingerida na dieta ou administrada através de suplementos dietéticos, é absorvida pelas células epiteliais do intestino delgado pelo SVCT-1 e, conseqüentemente, difunde-se primeiramente pelos capilares circundantes e depois pelo restante sistema circulatório. No rim, o AA circulante é filtrado dos capilares glomerulares para a cápsula de Bowman. À medida que passa através do túbulo contornado proximal, o AA é reabsorvido para a rede de capilares que rodeiam esta porção do nefrônio, através do SVCT-1 das células epiteliais renais. A diferença entre a quantidade de AA filtrado e absorvido constitui a excreção renal (Li & Schellhorn, 2007).

A absorção intestinal e a excreção renal influenciam o nível sérico da vitamina C e a sua biodisponibilidade. Em baixas concentrações, a vitamina C é absorvida pelo intestino delgado e reabsorvida no túbulo renal. Contudo, quando presente em elevadas concentrações, o SVCT-1 atinge a saturação, limitando a quantidade de AA absorvido

no intestino e reabsorvido no rim. Este facto impõe uma restrição fisiológica na concentração efetiva máxima de vitamina C atingível pelo consumo oral, com consequências na sua biodisponibilidade (Li & Schellhorn, 2007). Segundo estudos previamente realizados, este valor máximo corresponde a aproximadamente 200  $\mu\text{mol/L}$ , embora as concentrações séricas fisiológicas “normais” de ascorbato em indivíduos saudáveis variem entre 60 e 100  $\mu\text{mol/L}$  (Levine *et al*, 1996; Padayatty *et al*, 2004). Em indivíduos saudáveis em estado estacionário, o limite da excreção renal de ascorbato foi observado com a ingestão diária de 60 a 100 mg de vitamina C. Em casos de consumo diário superior a 500 mg, a maioria do ascorbato é excretado por via renal num período de 24 horas (Packer *et al*, 2002; Levine *et al*, 2005). No entanto, as concentrações de vitamina C nos glóbulos vermelhos circulantes são consideravelmente mais elevados que as do plasma, tendo em conta que estas células expressam SVCT-2, o qual medeia a acumulação de ascorbato a nível intracelular (Li & Schellhorn, 2007).

Relativamente à forma oxidada da vitamina C, o DHA, não existe informação disponível sobre a sua excreção ou reabsorção renal, pelo facto de este não ser detetado no plasma (Packer *et al*, 2002).

### **Funções bioquímicas e biológicas**

O ser humano requer vitamina C para a concretização de funções fisiológicas normais (Iqbal *et al*, 2004), como ilustrado na Figura 13. A vitamina C é um nutriente essencial e o mais importante antioxidante hidrossolúvel presente no plasma, e desempenha um papel crítico na biossíntese de neurotransmissores e colagénio, na absorção de ferro livre, na destoxificação de compostos exógenos e na regulação da subunidade I- $\alpha$  do fator de transcrição induzido pela hipoxia (HIF-1 $\alpha$ , do inglês *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ). Além disso, a vitamina C atua como antioxidante e neutralizador de radicais livres e confere proteção contra a peroxidação lipídica (Shaghghi *et al*, 2016). Elevadas concentrações de vitamina C são usadas no tratamento e prevenção de várias doenças, inclusive a diabetes, cataratas, glaucoma, degeneração macular, aterosclerose, acidente vascular cerebral, doenças cardíacas e cancro (Iqbal *et*

al, 2004). Desta forma, a manutenção de concentrações plasmáticas de vitamina C no plasma é crucial para a garantia das funções metabólicas normais e prevenção de várias doenças complexas comuns, tais como, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas e cancro (Shaghghi et al, 2016).

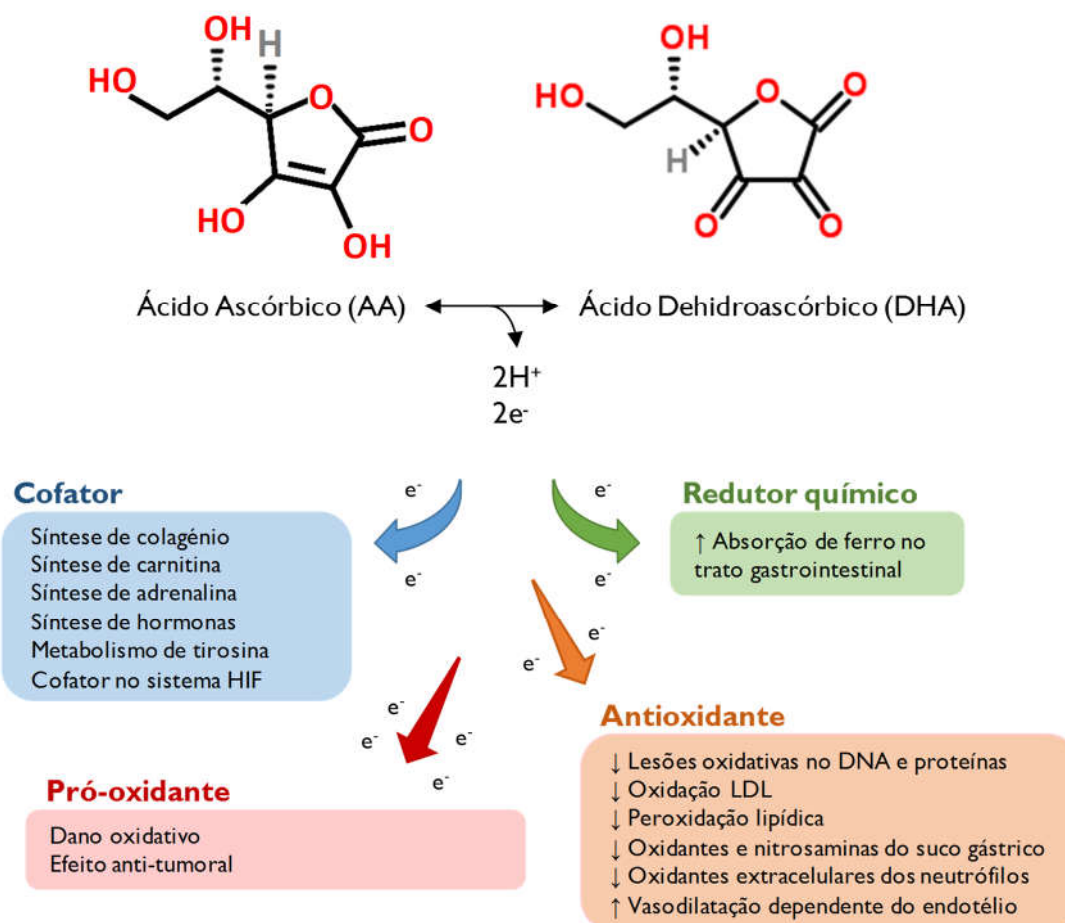


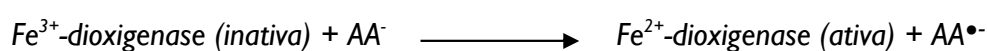
Figura 13: Funções da vitamina C. A oxidação do ácido ascórbico (AA) em ácido dehidroascórbico (DHA) liberta 2 eletrões que ficam disponíveis para reações químicas observadas *in vivo* e/ou *in vitro*. Elevadas concentrações de AA aumentam a disponibilidade do ião ferro, o qual mediará a produção de espécies reativas, potencialmente responsáveis pelo efeito anti-tumoral da vitamina C. Legenda: “↑” significa aumento e “↓” significa diminuição.

### Cofator de enzimas

De uma forma geral, o ascorbato está envolvido em vários processos biológicos e bioquímicos, nos quais se incluem reações enzimáticas catalisadas por membros da

família de dioxigenases dependentes de  $\text{Fe}^{2+}$ -2-oxoglutarato. Estas dioxigenases usam o 2-oxoglutarato como co-substrato e como fonte para dois dos quatro elétrons necessários à redução da molécula de oxigénio. Tal como evidenciado na reação 1, o monoanião ascorbato ( $\text{AA}^-$ ) é necessário para a manutenção do ferro no estado ferroso (isto é, com número de oxidação +2), de modo que a sua conversão em radical ascorbil irá manter a atividade máxima desta classe de enzimas (Du *et al*, 2012).

Reação 1:



Parte das funções biológicas da vitamina C estão, assim, relacionadas com a sua eficácia como dador de elétrons, isto é, como agente redutor. A vitamina C é um dador de elétrons específico para oito enzimas (Levine, 1999; Packer *et al*, 2002; Levine *et al*, 2005). Três dessas enzimas, a prolina hidroxilase, a lisina hidroxilase e a pro-colagénio-prolina 2-oxoglutarato 3-dioxigenase, participam na hidroxilação do colagénio. Muitas das manifestações de escorbuto, doença provocada pela deficiência em vitamina C, estão relacionadas com a alteração na síntese de colagénio (uma proteína fundamental do tecido conjuntivo), nomeadamente a fragilidade dos vasos sanguíneos, perda de dentes, doenças do tecido ósseo e conjuntivo, e comprometimento da cicatrização de feridas (Packer *et al*, 2002).

A vitamina C é também imprescindível para a atividade máxima de duas enzimas dioxigenases, a  $\gamma$ -butirotetraína 2-oxoglutarato 4-dioxigenase e a trimetil-lisina 2-oxoglutarato dioxigenase, envolvidas na biossíntese de carnitina. A carnitina é essencial para a  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos de cadeia longa, desempenhando um papel crítico na modulação do metabolismo energético a nível da mitocôndria. A translocação dos ácidos gordos do citosol para a matriz mitocondrial, onde ocorre a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, é dependente de carnitina. A deficiência em vitamina C resulta na diminuição variável dos níveis de carnitina no músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado e rim (Ball, 2004).

A vitamina C é ainda necessária para a biossíntese de noradrenalina, na medida

em que é co-substrato para a dopamina- $\beta$ -monooxigenase, enzima que catalisa a conversão do neurotransmissor dopamina em noradrenalina. Alterações neuropsiquiátricas associadas ao escorbuto, incluindo depressão, alterações de humor e hipocondria poderão estar relacionadas com a hidroxilação insuficiente da dopamina (Packer *et al*, 2002).

Duas outras enzimas são também conhecidas por requerem a vitamina C como co-substrato, embora a sua relação com a condição patológica de escorbuto ainda não tenha sido estabelecida. A peptidil glicina  $\alpha$ -amida monooxigenase é necessária para a amidação das hormonas peptídicas e a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase participa no metabolismo da tirosina (Packer *et al*, 2002; Levine *et al*, 2005).

### *Cofator no sistema HIF*

A vitamina C desempenha um papel importante na transcrição de genes mediada pelo HIF-1 $\alpha$ , na medida em que a atividade do HIF-1 $\alpha$  é regulada por reações de hidroxilação que, por sua vez, requerem a presença de ascorbato (Mandl *et al*, 2009). Alvos transcripcionais diretos do HIF-1 incluem genes que regulam o crescimento e a apoptose, a migração celular, o metabolismo energético, a angiogénese, as funções vasomotora, de matriz e barreira e o transporte de iões metálicos e de glicose (Schofield & Ratcliffe, 2004; Boulahbel *et al*, 2009). A ligação do HIF-1 requer a dimerização das subunidades  $\alpha$  (sensível à presença de oxigénio) e  $\beta$  (insensível à presença de oxigénio). Em condições de normoxia, a subunidade HIF-1 $\alpha$  é degradada por hidroxilação através das prolin hidroxilases específicas do HIF, reprimindo a transcrição de genes alvo. Sob condições de hipoxia, característica de tumores de rápido crescimento, o HIF-1 $\alpha$  é induzido, entra no núcleo e forma um heterodímero com a subunidade  $\beta$ ; desta forma, a hidroxilação do HIF-1 $\alpha$  é suprimida, resultando no aumento da transcrição de genes dependentes do HIF, responsáveis pela angiogénese e pelo crescimento tumoral (Traber & Stevens, 2011; Du *et al*, 2012). Tendo em conta que a prolin hidroxilase HIF-1 $\alpha$  é estimulada pela presença de AA (Flashman *et al*, 2010), níveis reduzidos de vitamina C diminuem a hidroxilação do HIF-1 $\alpha$  e, conseqüentemente, promovem a transcrição de



genes e o crescimento tumoral (Traber & Stevens, 2011). *Kuiper* e seus coautores mostraram que os níveis de HIF-1 $\alpha$  e dos seus alvos estavam aumentados nos tecidos tumorais humanos. Contudo, os tumores com maiores níveis de ascorbato apresentavam menor ativação do HIF-1, enquanto os tumores com maior ativação de HIF-1 e um fenótipo tumoral mais agressivo apresentavam menores níveis de ascorbato (*Kuiper et al*, 2010). Estes factos indicam que níveis tecidulares de ascorbato aumentados poderão proteger contra a ativação de HIF-1 e um comportamento tumoral mais agressivo (*Du et al*, 2012).

### *Absorção de ferro*

O ferro presente nos alimentos naturais existe em duas formas, ferro hémico e ferro não-hémico ou inorgânico. O ferro hémico é obtido da hemoglobina presente nos capilares sanguíneos e da mioglobina dos músculos da carne, peixe ou aves. O ferro inorgânico é encontrado principalmente em alimentos vegetais, como cereais, nozes, leguminosas, frutas e legumes. A vitamina C influencia os mecanismos de absorção de ferro. Ao contrário da absorção do ferro hémico, o ferro inorgânico é afetado pela presença de vitamina C e por outros constituintes da dieta. A absorção de ferro inorgânico é assim melhorada pela sua co-ingestão com substâncias de baixo peso molecular. Algumas dessas substâncias incluem o AA, o ácido cítrico, e alguns açúcares, entre outros. O AA, como agente redutor, auxilia na manutenção do ferro no seu estado ferroso, permitindo a formação de complexos ferro-ascorbato mais solúveis e rapidamente absorvidos (*Ball*, 2004).

Em indivíduos saudáveis, o ferro é amplamente sequestrado por proteínas como a transferrina e a ferritina. A transferrina é uma glicoproteína sintetizada no fígado e constitui a principal proteína circulante de ligação ao Fe<sup>3+</sup>, com elevada afinidade, mas com reduzida capacidade para o mesmo. A transferrina liga-se avidamente ao recetor de transferrina da membrana celular, formando o complexo “transferrina-recetor” que é internalizado para um endossoma. As condições acídicas do endossoma viabilizam a libertação do ferro, o qual é posteriormente reduzido e transportado pelo

transportador DMT1 (do inglês *divalent metal transporter 1*) para o citoplasma, onde será utilizado para a síntese de proteínas ou ligado à ferritina, uma proteína responsável pelo armazenamento de ferro. O ferro armazenado na ferritina pode ser libertado por redutores biológicos apropriados, tais como tióis, ascorbato e flavinas reduzidas. A libertação de ferro permitirá à célula sintetizar citocromos e enzimas que contenham ferro (Du *et al*, 2012).

O ascorbato modula o metabolismo de ferro pela estimulação da síntese de ferritina, inibindo a degradação da ferritina a nível lisossomal e diminuindo o efluxo celular de ferro (Lane & Richardson, 2014). Estudos recentes indicam ainda que o ascorbato constitui um novo modelador da via clássica de captação de ferro associado à transferrina, a qual providencia praticamente todo o ferro para suprir as necessidades da célula e para a eritropoiese em condições fisiológicas. O ascorbato estimula a captação de ferro dependente de transferrina por um mecanismo de redução intracelular, aumenta a expressão de ferritina e aumenta a deposição de ferro na ferritina (Lane *et al*, 2013).

### *Antioxidante*

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparativamente com um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação do substrato. Várias propriedades da vitamina C tornam-na um antioxidante ideal em sistemas biológicos (Packer *et al*, 2002). O ascorbato é um importante antioxidante fisiológico, potente neutralizador de radicais livres, com capacidade para regenerar outros antioxidantes no corpo humano, incluindo o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). A vitamina C pode reduzir radicais de oxigénio, de nitrogénio e de enxofre. Estudos realizados em plasma humano com baixas concentrações de vitamina C mostraram que esta protege os lípidos plasmáticos contra a lesão peroxidativa induzida pelos radicais peróxido (Kumar *et al*, 2015).

Hoje em dia, a investigação tem procurado examinar até que ponto a vitamina C,

pela sua atividade antioxidante, que lhe permite limitar os efeitos prejudiciais dos radicais livres, poderá ajudar na prevenção de certos tipos de cancro e outras doenças, nas quais o stresse oxidativo desempenha um papel crucial (Kumar *et al*, 2015).

Os baixos potenciais de redução de um eletrão do ascorbato e do radical ascorbil permitem-lhes reagir e reduzir virtualmente todas as ROS e RNS fisiologicamente relevantes (Packer *et al*, 2002). A concentração normal de ascorbato no plasma de indivíduos saudáveis ronda os 40 a 80  $\mu\text{M}$ . Nestas concentrações o ascorbato atua como antioxidante endógeno. Termodinamicamente, o ascorbato rapidamente doa um eletrão a radicais oxidantes potencialmente nocivos, como o radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), o radical alcóxido ( $\text{RO}^\bullet$ ), o radical peróxido ( $\text{LOO}^\bullet$ ), o radical tiol ( $\text{GS}^\bullet$ ) e os radicais tocoferóxido ( $\text{TO}^\bullet$ ) (Du *et al*, 2012). Os radicais hidroxilo reagem muito rapidamente, apesar de não o fazerem preferencialmente com a vitamina C; por serem tão reativas, estas ROS difundem-se e combinam-se indiscriminadamente com qualquer substrato a uma taxa limitada (Packer *et al*, 2002).

Outra propriedade que torna a vitamina C num antioxidante ideal é a baixa reatividade do radical ascorbil ( $\text{AA}^\bullet$ ), formado aquando da neutralização de ROS ou RNS. O radical ascorbil nem é fortemente oxidante nem fortemente redutor, além de reagir fracamente com o oxigénio. Assim, quando um radical reativo interage com o ascorbato, a sua oxidação resulta na produção do radical ascorbil, o qual é relativamente não-reativo. O radical ascorbil neutraliza outro radical ou pode também ser sujeito a dismutação dependente do pH, resultando na formação de ascorbato e de DHA (reação 2). Alternativamente, o DHA e o radical ascorbil podem ser reduzidos enzimaticamente por redutases dependentes de NADH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) e NADPH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*) (Packer *et al*, 2002; Du *et al*, 2012).

Reação 2:



A peroxidação lipídica (LPO, do inglês *lipid peroxidation*) pode ser considerada um

exemplo de uma reação em cadeia de radicais. As ROS produzidas por diversas fontes, como a cadeia transportadora de elétrons, a xantina oxidase, a mieloperoxidase e a oxidase NADPH, inicia uma reação de radicais que culmina na formação de radicais lipídicos. Os lípidos são frequentemente alvos dos radicais de oxigénio, pelo facto de muitas enzimas promotoras de ROS estarem incorporadas em bicamadas lipídicas. Radicais lipídicos reagem com o oxigénio molecular formando radicais peroxilo, os quais, se não forem neutralizados pelo  $\alpha$ -tocoferol presente nas membranas, poderão participar na reação de propagação de radicais. A vitamina C tem a capacidade de proteger contra o processo de LPO atuando como neutralizador de ROS e pela redução de um elétron em radicais hidropoxilo lipídicos via ciclo redox da vitamina E (Traber & Stevens, 2011).

Graças aos seus efeitos metabólicos e antioxidantes, o AA reduz o risco de doenças cardiovasculares, na medida em que os seus efeitos metabólicos e antioxidantes estão associados à inibição de alguns passos envolvidos na aterosclerose e na trombose (Ball, 2004). É conhecido o papel de modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoprotein*) na patogénese da aterosclerose. Por outro lado, a reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO) é uma das principais vias de oxidação da LDL *in vivo*. Estudos demonstraram que a vitamina C é capaz de melhorar a resistência da LDL à modificação oxidativa, podendo ser benéfica na prevenção de lesões que resultem em aterosclerose (Shariat *et al*, 2013).

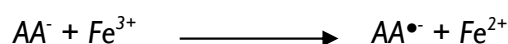
### *Pró-oxidante*

O ascorbato é considerado um agente redutor; ele é capaz de atuar como um antioxidante em processos de oxidação mediados por radicais livres. Contudo, como agente redutor, o ascorbato é igualmente capaz de reduzir metais redox-ativos, tais como o cobre e o ferro, aumentando assim a química pró-oxidante destes metais. Assim, o ascorbato pode atuar como pró-oxidante e como antioxidante, de acordo com as concentrações em que está presente (Mandl *et al*, 2009). Estes efeitos paradoxais dependem da capacidade de metais de transição nas suas formas reduzidas (por exemplo,

$\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ ) catalisarem a produção de radicais livres (Ball, 2004).

A atividade pró-oxidante do AA está relacionada com a manutenção do ferro no estado de oxidação +2 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e, conseqüentemente, num estado de oxidação que permite a produção de espécies reativas. Na verdade, misturas de AA com cobre ou com ferro têm sido usadas durante décadas para induzir modificações oxidativas em lípidos, em proteínas e no DNA. Assim, o AA pode contribuir para a formação de lesão oxidativa pela redução de iões férrico  $\text{Fe}^{3+}$  a iões ferroso  $\text{Fe}^{2+}$  (do mesmo modo de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ ), sendo oxidado em radical ascorbil (reação 3). Por sua vez, o  $\text{Fe}^{2+}$  pode rapidamente reagir com uma molécula de oxigénio, reduzindo-a a radical superóxido (reação 4), o qual é dismutado em peróxido de hidrogénio e oxigénio (reação 5) (Du et al, 2012; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2015).

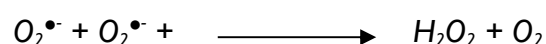
Reação 3:



Reação 4:

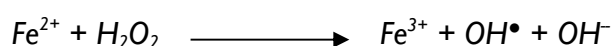


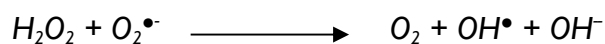
Reação 5:



Na clássica reação de *Fenton* (reação 6) o  $\text{Fe}^{2+}$  reage com o peróxido de hidrogénio e produz  $\text{Fe}^{3+}$  e o potente oxidante radical hidroxilo. Este pode também ser formado através da reação de *Haber-Weiss*, na presença de um excesso de peróxido de hidrogénio e de radical superóxido (reação 7) (Du et al, 2012).

Reação 6 (reação de Fenton):



Reação 7 (reação de Haber-Weiss):

A presença de ascorbato poderá permitir a reciclagem do  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$ , catalisando a formação de oxidantes altamente reativos a partir do peróxido de hidrogénio (Du *et al*, 2012). No entanto, de uma forma geral estas reações de *Fenton* mediadas pela vitamina C deverão ser controladas devido aos mecanismos eficazes de sequestro de ferro, levadas a cabo por proteínas de ligação a metais, como o caso da ferritina e da transferrina (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2015). *Chen* e seus coautores mostraram que o AA induz a formação de níveis detetáveis de peróxido de hidrogénio no meio extracelular, mas não no sangue. Estes dados indicam que o ascorbato presente em concentrações farmacológicas pela administração via intravenosa poderá atuar como um pró-fármaco na entrega de peróxido de hidrogénio às células, com implicações terapêuticas major (*Chen et al*, 2005).

Assim, os efeitos pró-oxidantes do ascorbato têm elevada preponderância *in vivo*, dependendo da disponibilidade de iões metálicos catalíticos (Du *et al*, 2012). Embora não hajam evidências diretas do aumento dos níveis de ferro catalítico em tumores, vários doentes com neoplasia apresentam concentrações elevadas de ferro no soro e nos tecidos (Güner *et al*, 1992; Miyata *et al*, 2001). Níveis elevados de ferritina circulante foram detetados em crianças com linfoma de *Hodgkin* e correlacionados com uma reduzida sobrevivência (Hann *et al*, 1990). Em 2016, *Farruggia* e seus coautores avaliaram alguns marcadores biológicos de prognóstico e verificaram que níveis elevados de plaquetas, de eosinófilos e de ferritina estavam associados a um pior prognóstico (*Farruggia et al*, 2016). Estudos em doentes com cancro do pâncreas localmente avançado mostraram igualmente que a ferritina sérica pode constituir um fator de prognóstico preditivo e de resposta ao tratamento (Wang *et al*, 2015a). Por outro lado, tem sido proposto que proteínas extracelulares contendo metais são essenciais para os efeitos pró-oxidantes do ascorbato, sendo a ferritina saturada em ferro um potencial candidato como fonte de ferro. Consistentemente, estudos demonstraram que o ascorbato tem a capacidade de libertar o ferro da ferritina celular. Para além destes

factos, sabe-se que níveis reduzidos de metais catalíticos são suficientes para aumentar substancialmente a taxa de oxidação do ascorbato (Du *et al*, 2012). Todas estas evidências poderão estar implicadas no mecanismo pelo qual concentrações farmacológicas de ascorbato podem potencialmente contribuir para o seu efeito terapêutico em certos tipos de cancros.

## **A vitamina C no tratamento do cancro**

A utilização de concentrações farmacológicas de vitamina C como potencial agente quimioterapêutico no cancro é controversa. Uma série de estudos efetuados mostram que elevadas concentrações de vitamina C têm efeitos anti-cancerígenos, enquanto outros estudos sugerem o contrário (Uetaki *et al*, 2015).

### ***Primeiras descobertas e controvérsias***

Em 1952 *McCormick* sugeriu, pela primeira vez, o potencial da vitamina C no tratamento do cancro (*McCormick*, 1952). Nos anos 70, *Linus Pauling* e *Ewan Cameron* reportaram uma sobrevivência significativamente prolongada de doentes com cancro em fase terminal, após tratamento com concentrações elevadas de ascorbato. Os doentes sujeitos à administração de ascorbato tiveram um tempo de sobrevivência médio de mais de 210 dias. Em contraste, o grupo controlo, doentes tratados de forma idêntica, mas sem suplementação de ascorbato, tiveram um tempo de sobrevivência médio de 50 dias (*Cameron & Pauling*, 1976, 1978). Estes dois estudos apresentaram algumas questões metodológicas controversas (análises retrospectivas, não foi um estudo cego e não teve um grupo placebo) e foram refutados subsequentemente por dois ensaios clínicos cegos e controlados com placebo realizados na *Mayo Clinic* e financiados pelo *National Cancer Institute* (*Creagan et al*, 1979; *Moertel et al*, 1985). Em ambos os ensaios foram administradas 10 g/dia de vitamina C ou de placebo, não evidenciando qualquer benefício na sobrevivência global dos doentes oncológicos tratados com o ascorbato

(Frei & Lawson, 2008). No entanto, diferentes regimes terapêuticos foram utilizados, isto é, enquanto *Pauling* e *Cameron* administraram o ascorbato aos doentes por via oral e por via intravenosa (i.v.), *Creagan* e *Moertel* apenas utilizaram a via oral. Esta discrepância tem sido amplamente reconhecida como a razão para os resultados controversos, na medida em que há a necessidade crucial de que a administração de vitamina C seja feita por via i.v., em vez de suplementação oral, para assegurar as concentrações elevadas de fármaco e, conseqüentemente, um efeito citotóxico no tumor (Venturelli *et al*, 2015). Estudos mais recentes mostraram que elevadas concentrações de vitamina C no plasma apenas podem ser atingíveis se a administração for feita por via i.v. ou intraperitoneal, tendo em conta que a taxa de absorção no intestino é diminuta, o que torna difícil a obtenção de elevadas concentrações séricas. As concentrações plasmáticas de vitamina C em humanos após a administração de altas concentrações por via i.v. são aproximadamente 200 vezes superiores às que são passíveis de ser atingidas por via oral (Figura 14) (Levine *et al*, 1996; Padayatty *et al*, 2004; Duconge *et al*, 2008). Na última década, um conjunto de evidências baseadas em modelos *in vitro*, em modelos *in vivo* e em estudos clínicos corroboram a hipótese de que elevadas massas de ascorbato podem ter um efeito potencialmente citotóxico sobre as células tumorais (Wilson *et al*, 2014; Venturelli *et al*, 2015).

### **Avanços na investigação pré-clínica**

Ao longo dos últimos anos, vários autores têm avaliado o efeito citotóxico da vitamina C em células tumorais *in vitro*, verificando que esta é capaz de inibir a proliferação celular e/ou induzir a morte celular em vários tipos de células tumorais, incluindo de mesotelioma (Takemura *et al*, 2010), de cancro do pâncreas (Cullen, 2010; Du *et al*, 2010; Cieslak & Cullen, 2015; Fukui *et al*, 2015), de leucemia (Roomi *et al*, 1998; Kawada *et al*, 2013; Mastrangelo *et al*, 2013, 2015), de retinoblastoma (Mastrangelo, 2013), de cancro da mama (Kim *et al*, 2012; Uetaki *et al*, 2015), de cancro do pulmão (Kim *et al*, 2012), de cancro da próstata (Chen *et al*, 2012b), de cancro do ovário (Ma *et al*, 2014), de glioblastoma (Klingelhoeffer *et al*, 2012), de melanoma (Serrano *et al*, 2015)



e de cancro do cólon (Uetaki *et al*, 2015; Pires *et al*, 2016).

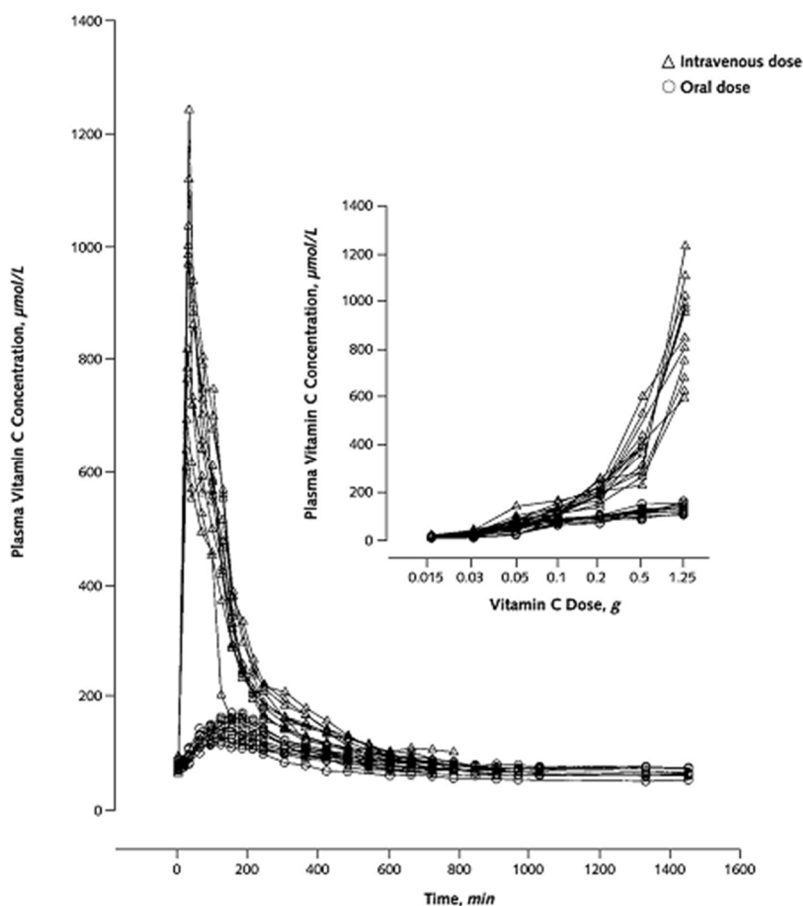


Figura 14: Concentrações de vitamina C no plasma de indivíduos voluntários após administração intravenosa (i.v.) e oral de vitamina C. As concentrações plasmáticas estão representadas em função do tempo, após administração de 1,25 g p.o. ou i.v., em condição estacionária em 12 indivíduos (3 homens e 9 mulheres). A imagem *inset* mostra os picos das concentrações plasmáticas de vitamina C em função da massa, após administração oral ou i.v.. 17 indivíduos (7 homens e 10 mulheres) receberam massas entre 0,015 a 0,1 g; 16 indivíduos (6 homens e 10 mulheres) receberam 0,2 g; 14 indivíduos (6 homens e 8 mulheres) receberam 0,5 g; e 12 indivíduos (3 homens e 9 mulheres) receberam 1,25 g. A administração foi sempre feita em condição estacionária. Retirado de (Padayatty *et al*, 2004).

Os promissores resultados obtidos *in vitro* com elevadas concentrações de vitamina C fizeram com que vários grupos de investigação por todo o mundo testassem o efeito da administração de concentrações farmacológicas de ascorbato em modelos animais de cancro. Dessa forma, a inibição do crescimento tumoral em xenotransplantes foi demonstrada em diferentes modelos animais, nomeadamente de gliossarcoma (Chen *et al*, 2008a), de cancro do pâncreas (Chen *et al*, 2008a; Du *et al*, 2010; Espey *et al*, 2011),

de cancro do ovário (Chen *et al*, 2008a; Ma *et al*, 2014), de cancro da próstata (Pollard *et al*, 2010), de hepatocarcinoma (Casciari *et al*, 2005; Verrax & Calderon, 2009), de cancro do cólon (Mamede *et al*, 2012b), de melanoma (Serrano *et al*, 2015), de mesotelioma (Takemura *et al*, 2010), de cancro da mama (Wei *et al*, 2012) e de neuroblastoma (Deubzer *et al*, 2010).

### **Mecanismos de ação**

Um dos aspetos que necessariamente deverá ser compreendido diz respeito ao mecanismo de ação da vitamina C em concentrações elevadas administrada por via i.v.. Investigações recentes têm-se centrado na importância dos efeitos extracelulares e dos efeitos intracelulares da vitamina C (Wilson *et al*, 2014).

#### *Mecanismos extracelulares para a ação da vitamina C*

Mark Levine e o seu grupo de investigação foram pioneiros na demonstração dos mecanismos anti-tumorais moleculares básicos do ascorbato em três artigos científicos consecutivos (Chen *et al*, 2005, 2007, 2008a). Nestes estudos os autores demonstraram que, tanto em diferentes modelos *in vitro* como em diferentes modelos *in vivo*, acima de determinada concentração o ascorbato atua como um pró-fármaco e pró-oxidante na formação de radical ascorbil e de peróxido de hidrogénio. Em células tumorais, um aumento da produção de ROS e uma alteração no estado redox foram observados. Consequentemente, foi especulado que o aumento exógeno do stresse oxidativo nas células tumorais causaria o aumento das ROS intracelulares acima de um limite tóxico, que ultrapassa a capacidade antioxidante da célula (Venturelli *et al*, 2015). Chen e seus coautores, no grupo liderado por Mark Levine, testaram o efeito do ascorbato em 48 linhas celulares tumorais e verificaram que o ascorbato induziu um efeito citotóxico seletivo nas células tumorais. Em média, os valores de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória média) de ascorbato obtidos nas linhas celulares tumorais foi inferior a 10 mM, para

tempos de incubação inferiores a 2 horas, enquanto as linhas celulares normais toleraram concentrações de ascorbato muito superiores. Assim, os autores verificaram que o ascorbato não teve qualquer efeito tóxico em linhas celulares humanas normais, nomeadamente nos glóbulos brancos, nos fibroblastos e nas células epiteliais (Chen *et al*, 2005, 2008a). O efeito citotóxico do ascorbato foi recentemente confirmado por Sinnberg e seus coautores, num estudo realizado em 60 linhas celulares do painel NCI60 (do inglês, *US National Cancer Institute 60 human tumour cell line anticancer drug screen*), tendo obtido um valor de IC<sub>50</sub> médio de 4,5±3,6 mM (Sinnberg *et al*, 2014).

Apesar de muitas hipóteses poderem ser testadas para explicar o efeito anti-tumoral do ascorbato, Chen e seus coautores optaram por investigar até que ponto os produtos de reação obtidos por intermédio do ascorbato *in vitro* eram igualmente encontrados *in vivo* (Chen *et al*, 2007). Baseado nos resultados obtidos, os autores estabeleceram a teoria de que elevadas concentrações de ascorbato a nível parental constituem um sistema de entrega de peróxido de hidrogénio à célula tumoral, pela produção de radical ascorbil, o qual medeia a produção de peróxido de hidrogénio a nível extracelular. Tal como evidenciado na Figura 15, o peróxido de hidrogénio formado seria o responsável pela lesão oxidativa induzida na célula tumoral (Chen *et al*, 2015a). A administração das elevadas massas de ascorbato por via i.v. permite a obtenção de concentrações farmacológicas no sangue, sendo posteriormente distribuído para os espaços extracelulares. No meio extracelular, o ascorbato é oxidado, transferindo um eletrão para a molécula de oxigénio, via metais de transição catalisadores (Reações 3 e 4), resultando na formação de radical ascorbil e de radical superóxido (Chen *et al*, 2007). Apesar da identidade do catalisador não ter sido esclarecida, um estudo posterior sugeriu que a ferritina pode ser a fonte de ferro para a produção de ROS (Deubzer *et al*, 2010). O radical superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) com formação de peróxido de hidrogénio (Chen *et al*, 2007). No sangue, estas reações são inibidas porque o sangue apresenta elevados níveis de defesas antioxidantes que reduzem o radical ascorbil ou que degradam o peróxido de hidrogénio formado (Figura 15). Dessa forma, a toxicidade a nível do sangue é limitada (Chen *et al*, 2015a). Vários autores demonstraram que a presença de catálase a nível intracelular ou extracelular

protege as células da citotoxicidade induzida pelo ascorbato, comprovando o papel fundamental do peróxido de hidrogénio na toxicidade do ascorbato (Ohno *et al*, 2009; Verrax & Calderon, 2009; Du *et al*, 2010; Takemura *et al*, 2010; Ullah *et al*, 2011).

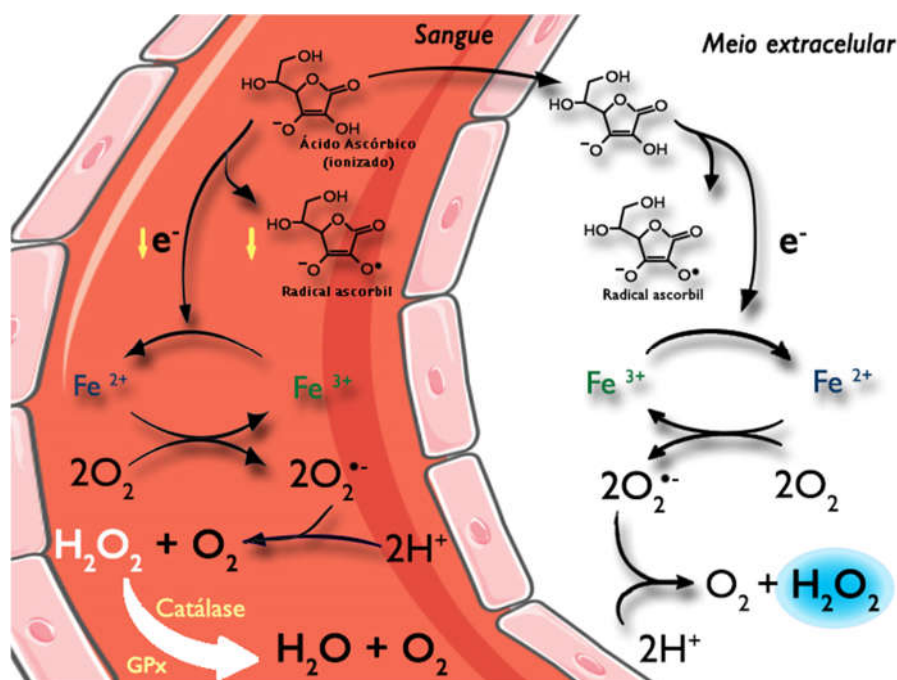


Figura 15: Elevadas concentrações de vitamina C administradas por via i.v. atuam como um sistema de entrega de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aos tecidos. Após a administração i.v., níveis farmacológicos de ácido ascórbico são atingidos no sangue, sendo este posteriormente distribuído para os espaços extravasculares, onde se atingem concentrações de ascorbato idênticas. No fluido extracelular (à direita), a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é mediada pela oxidação do ascorbato com conseqüente transferência de um elétron por um metal catalisador e dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . No sangue (à esquerda), estas reações são inibidas primeiramente pela atividade da semi-dehidroascorbato redutase nas membranas dos glóbulos vermelhos para minimizar a formação do radical ascórbil. Secundariamente, as atividades abundantes da catalase e da glutatona peroxidase (GPx) no sangue degradam qualquer  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado. Baseado em (Chen *et al*, 2015a) e construído com recurso a Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

O modelo de atuação extracelular do ascorbato proposto por Chen e seus coautores foi corroborado por Deubzer e seus colaboradores, com a introdução de novos fatores preponderantes. Após um estudo realizado em linhas celulares de neuroblastoma, os autores apontaram outras duas características das células tumorais que poderão estar na origem da toxicidade seletiva do ascorbato contra as mesmas (Figura 16): (1) o seu elevado conteúdo em ferritina e (2) a sua elevada taxa de glicólise

aeróbia (Deubzer *et al*, 2010).

Para que o ascorbato contribua para a formação de peróxido de hidrogénio, é impreterível a presença de metais de transição, como o ferro (Frei & Lawson, 2008). A formação de peróxido de hidrogénio inicia-se com a formação de radical superóxido, cuja produção pode ser mantida na presença abundante de ascorbato. O radical superóxido desempenhará duas funções essenciais, a libertação de ferro da ferritina e a dismutação espontânea ou por intermédio da SOD em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Reação 5). Os autores mostraram ainda que as células de neuroblastoma possuem níveis elevados de ferritina e libertam maiores quantidades de ferro para o microambiente do que os fibroblastos, podendo este constituir um fator preponderante na citotoxicidade seletiva do ascorbato. No interior da célula tumoral, o peróxido de hidrogénio não é eficazmente detoxificado, devido aos níveis reduzidos de defesas antioxidantes, e causa lesões oxidativas, nomeadamente na molécula de DNA (Deubzer *et al*, 2010).

No que diz respeito à segunda característica, a elevada taxa de glicólise aeróbia acarreta aspetos interessantes que têm impacto no mecanismo de citotoxicidade do ascorbato (Figura 16). Primeiramente, muitas células tumorais acidificam o seu microambiente pela glicólise aeróbia (pela libertação de lactato) (Deubzer *et al*, 2010). Sabe-se que mesmo em condições aeróbicas, muitas células tumorais convertem quantidades consideráveis de glicose em lactato em vez de a usarem na fosforilação oxidativa, processo que é energeticamente mais eficaz (efeito de *Warburg*) (Upadhyay *et al*, 2013). Uma experiência piloto realizada por *Deubzer* e seus colaboradores mostrou que a libertação de lactato é superior em células de neuroblastoma em comparação com os fibroblastos, levando à diminuição do pH do microambiente tumoral. Em condições acídicas, a formação de precipitados de  $Fe^{3+}$  altamente insolúveis e inativos é prevenida e a libertação de ferro da ferritina é facilitada (Figura 16). Em segundo, em células sensíveis ao efeito de *Warburg* (como as células tumorais), quanto menor a taxa de respiração oxidativa, menor a produção de ROS. Consequentemente, os sistemas de defesa celular contra o stresse oxidativo estão sub-regulados e as células tornam-se mais sensíveis ao stresse oxidativo (Deubzer *et al*, 2010).

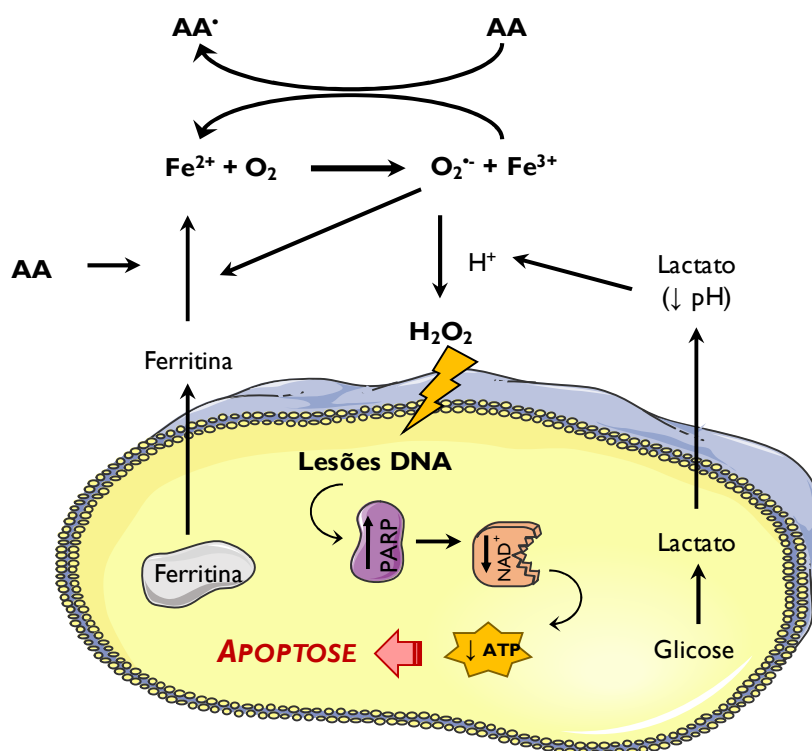


Figura 16: Modelo de produção de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no microambiente tumoral, na presença de elevadas concentrações de ascorbato. À esquerda, o  $\text{Fe}^{2+}$  é libertado da ferritina por intermédio do radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e provavelmente também diretamente pelo ascorbato. Na presença de oxigénio ( $\text{O}_2$ ), o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é formado. O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode dismutação espontânea ou por conversão via SOD formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . O  $\text{Fe}^{3+}$  anteriormente formado pode ser reduzido novamente pelo ascorbato, via radical ascorbil ( $\text{AA}^{\bullet}$ ) e a reação é mantida. À direita, muitas células tumorais acidificam o seu microambiente pela glicólise aeróbica (libertação de lactato), prevenindo a formação de precipitados de ferro inativos ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) e facilitando a libertação de  $\text{Fe}^{2+}$ , o qual catalisa a formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Construído através de Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

De uma forma geral, o modelo anti-tumoral da vitamina C, no qual concentrações farmacológicas de ascorbato medeiam a produção extracelular de radical ascorbil e de peróxido de hidrogénio, é consensualmente aceite. Contudo, os efeitos imprevisíveis das ROS nas células dificultam a definição de um mecanismo molecular geral aplicável a todos os tipos de células tumorais (Ma *et al*, 2014). Diferentes estudos têm sugerido uma variedade de mecanismos em diferentes sistemas celulares, incluindo a apoptose (Lin *et al*, 2006; Carosio *et al*, 2007; Hong *et al*, 2007), a morte celular não-apoptótica (Kang *et al*, 2003; Verrax *et al*, 2004, 2005; Chen *et al*, 2005), a depleção de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) (Chen *et al*, 2007, 2012b; Du *et al*, 2010; Ma *et al*, 2014; Fukui *et al*, 2015; Uetaki *et al*, 2015), o bloqueio do ciclo celular (Lin *et*

*al*, 2006; Frömberg *et al*, 2011; Herst *et al*, 2012) e a autofagia (Cullen, 2010; Du *et al*, 2010; Chen *et al*, 2011).

É evidente que vários mecanismos moleculares poderão ser ativados pelo aumento da produção de peróxido de hidrogénio e, conseqüentemente, ativados vários alvos celulares e moleculares, contudo, os estudos realizados por diversos investigadores mostram que a depleção de ATP poderá ser o seguinte desencadeador das vias de morte celular.

A depleção de ATP em células tumorais sensíveis pode constituir um potencial mecanismo para a morte celular seletiva da célula tumoral em detrimento da célula normal. Devido à disfunção mitocondrial, à hipoxia no microambiente tumoral, e a sinais oncogénicos, muitas células malignas dependem primordialmente da glicólise para a produção de ATP (efeito de *Warburg*). Desta forma, a síntese de ATP não é eficiente em comparação com as células normais que usam preferencialmente a fosforilação oxidativa. Por conseguinte, algumas células tumorais podem ser particularmente sensíveis a elevadas concentrações de ascorbato, em comparação com células normais (Chen *et al*, 2012b).

Chen e seus coautores propuseram que o peróxido de hidrogénio, por intermédio da ação do AA, pode difundir-se para o meio intracelular, causar a depleção de ATP em células sensíveis (células tumorais dependentes da glicólise) que, por sua vez, induzirá a morte celular. O ATP pode esgotar-se por três mecanismos evidenciados na Figura 17. (1) As lesões induzidas no DNA pelo peróxido de hidrogénio ativam as PARP (do inglês *poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase*); as PARPs ativadas catabolizam o  $\text{NAD}^+$ , esgotando o substrato necessário para a formação de NADH e conseqüente síntese de ATP. (2) O peróxido de hidrogénio é catabolizado pela concomitante oxidação de glutatona reduzida (GSH) em dissulfido GSH (GSSG). Para a redução de GSSG em GSH, a GSH redutase utiliza o NADPH, proveniente da glicose pela via das pentoses fosfato. A glicose usada para reduzir o  $\text{NADP}^+$  (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) em NADPH não pode por isso ser usada na glicólise ou na produção de NADH, pelo que a produção de ATP será diminuída. (3) O peróxido de hidrogénio pode lesar diretamente a mitocôndria, especialmente a ATP sintetase, pelo

que a produção de ATP declinará (Chen *et al*, 2007).

Ping Chen e seus coautores mostraram que concentrações elevadas de ascorbato induziram citotoxicidade em células tumorais de cancro da próstata, através da depleção de ATP que culminou em morte celular por autofagia (Chen *et al*, 2012b).

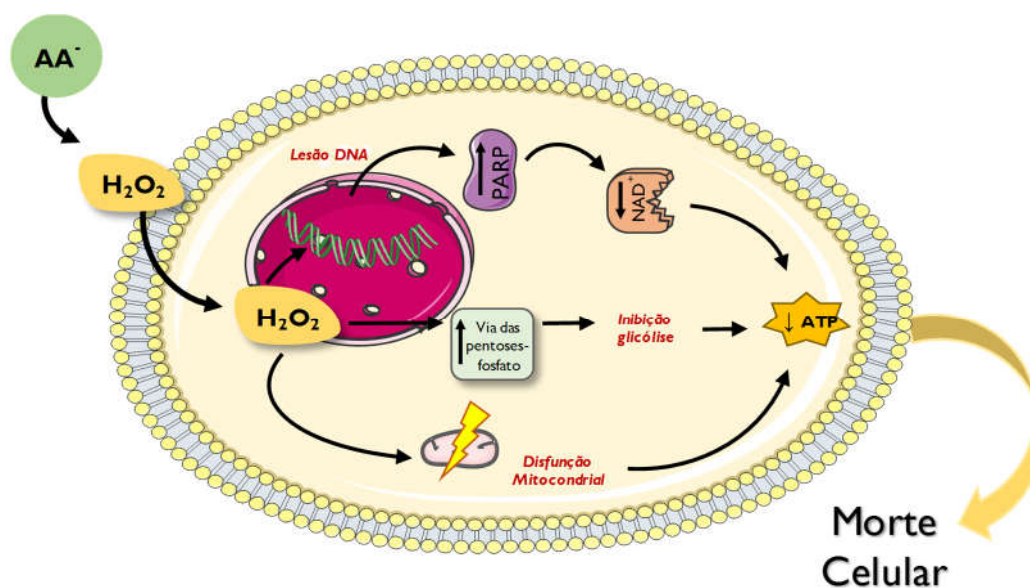


Figura 17: Possíveis mecanismos de depleção de ATP propostos por Chen *et al*. (2007). Concentrações farmacológicas de AA produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nível extracelular, o qual se difunde para o interior da célula, causando a morte celular desencadeada pela depleção de ATP em células sensíveis. O ATP pode esgotar-se por três mecanismos: (i) ativação das PARP; (ii) inibição da glicólise ou (iii) disfunção mitocondrial. Construído através de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Em 2014, Ma e seus coautores verificaram que a produção de ROS mediada por concentrações farmacológicas de ascorbato induziram lesões no DNA e depleção do ATP em células tumorais de ovário, mas não em células epiteliais normais do ovário. Consequentemente, foram desencadeadas uma série de respostas celulares que incluíram a ativação da via ATM/AMPK (ATM, do inglês *ataxia telangiectasia mutated* e AMPK, do inglês *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) e inibição da via mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin*). De facto, as lesões no DNA, a depleção de ATP e as vias ATM/AMPK/mTOR estão associadas à supressão da proliferação celular e bloqueio do ciclo celular, assim como, com a indução de apoptose, de necrose e de



autofagia (Ma *et al*, 2014).

Em 2015, Fukui e seus coautores investigaram o efeito do ascorbato em linhas celulares de cancro do pâncreas, dedicando especial atenção ao papel desempenhado pelo stresse oxidativo e pela autofagia, como elementos mecanísticos importantes nas ações anti-tumorais do ascorbato. De uma forma sumária, os autores corroboraram o mecanismo no qual o AA extracelular medeia a produção de peróxido de hidrogénio, com consequente aumento do stresse oxidativo e rápida depleção do ATP celular. A depleção de ATP levou à inibição da atividade da via mTOR, conhecida por aumentar a degradação de BCL-2. Por sua vez, a redução dos níveis de BCL-2 intracelulares conduzem à acumulação de *Beclin-1*, que medeia a formação do autofagossoma. O aumento da autofagia observada nas células tumorais tratadas com ascorbato pode constituir uma parte do mecanismo que contribui para a morte celular induzida pelo ascorbato (Fukui *et al*, 2015).

### *Mecanismos intracelulares para a ação da vitamina C*

Em adição aos processos extracelulares de produção de ROS dependentes do AA, mecanismos de citotoxicidade do AA podem igualmente ser desencadeados no espaço intracelular.

Como referido anteriormente, a vitamina C pode ser transportada para o interior da célula pelos SVCT-1 e SVCT-2. A forma oxidada da vitamina C, o DHA, pode também ser transportado pelos GLUTs para o interior da célula, onde é rapidamente convertido em AA (Rivas *et al*, 2008). Desta forma, a vitamina C poderá exercer o seu efeito a nível intracelular de forma dependente da expressão e função dos seus transportadores.

O HIF desempenha um papel importante na determinação dos padrões de expressão de genes em cancro e constitui um potencial alvo de ação intracelular da vitamina C. O HIF-1 $\alpha$  é degradado por hidroxilação por hidroxilases, que requerem a existência de cofatores como o ferro e o AA (Lu *et al*, 2005). A deficiência em vitamina

C compromete a hidroxilação do HIF, conduzindo à sobre-regulação do HIF-1 $\alpha$  (Visser *et al*, 2007). Vários estudos mostraram haver uma correlação entre a expressão de HIF e o uso de vitamina C.

Um estudo recente com 60 linhas celulares tumorais do painel NCI60 teve como objetivo avaliar até que ponto as condições de hipoxia poderiam ser, em parte, responsáveis pela resistência da célula tumoral à morte celular induzida pelo ascorbato (Venturelli *et al*, 2015). Os resultados indicaram que a hipoxia severa (característica de metástases tumorais), de facto, medeia a reduzida suscetibilidade das 60 linhas celulares tumorais face à inibição da proliferação celular induzida pelo ascorbato, com o aumento dos valores de IC<sub>50</sub> de 4,5 $\pm$ 3,6 mM (normoxia) para 10,1 $\pm$ 5,9 mM (hipoxia) (Sinnberg *et al*, 2014). Assim, os efeitos citotóxicos da vitamina C foram diretamente correlacionados com a hipoxia e a via de sinalização HIF, sugerindo que a oxigenação será importante para a eficácia citotóxica da vitamina C (Goodman, 2015).

Lu e seus coautores demonstraram que o efeito anti-tumoral do ascorbato é dependente da atividade das hidroxilases do HIF (Lu *et al*, 2005). Kuiper e coautores investigaram até que ponto, o conteúdo em ascorbato de tumores endometriais humanos, influenciava a atividade do HIF-1 e a própria patologia tumoral. Os autores verificaram que tumores com elevados níveis de ascorbato apresentavam menor ativação do HIF-1, enquanto tumores com elevada ativação de HIF-1 e com um fenótipo mais agressivo apresentavam níveis reduzidos de ascorbato (Kuiper *et al*, 2010). Estes dados indicam que níveis elevados de ascorbato nos tecidos poderá protegê-los contra a ativação do HIF e, conseqüentemente, contra um fenótipo mais agressivo (Du *et al*, 2012). Mais recentemente, Kuiper e seus coautores efetuaram um estudo semelhante em que mostraram que níveis de ascorbato mais elevados em tumores de cancro colorretal humano estão associados a uma menor ativação do HIF-1, principalmente devido à atividade do ascorbato como cofator das hidroxilases reguladoras do HIF. Os níveis elevados de ascorbato a nível do tumor foram também correlacionados com uma maior sobrevivência dos doentes (Kuiper *et al*, 2014).

Em suma, níveis elevados de ascorbato no tecido tumoral poderão ajudar a prevenir a formação de tumores sólidos, retardar as taxas de crescimento tumoral, inibir

o fenótipo agressivo do tumor assim como auxiliar no tratamento de câncros já estabelecidos (Kuiper & Vissers, 2014).

### **Avanços recentes na investigação clínica**

O uso de elevadas concentrações de vitamina C como abordagem adjuvante ou neoadjuvante no tratamento do cancro mantém a comunidade médica, em geral, dividida. Enquanto muitos investigadores e médicos aclamam as mais recentes descobertas e apoiam o seu uso, parte da comunidade médica sustenta um elevado ceticismo, provavelmente baseado nos resultados negativos obtidos nos estudos da *Mayo Clinic*, com a administração oral de vitamina C. Claramente, a eficácia da vitamina C no tratamento do cancro tem atualmente uma base científica sólida, mas que carece de ensaios clínicos robustos e validados. Contudo, vários investigadores clínicos iniciaram a translação dos resultados pré-clínicos para os estudos em humanos (Chen *et al*, 2015a).

Apesar dos dois ensaios clínicos realizados na *Mayo Clinic* com ascorbato por via oral terem falhado em mostrar qualquer benefício (Creagan *et al*, 1979; Moertel *et al*, 1985), diversos casos clínicos reportados têm providenciado resultados promissores com a terapia com ascorbato i.v. (Riordan *et al*, 1995, 2003, 2005).

A segurança e a farmacocinética da vitamina C foram inicialmente investigadas, verificando-se que a terapêutica com elevadas concentrações de ascorbato i.v. é suscetível de ser segura na maioria dos doentes, exceto em determinadas condições, nomeadamente doentes com insuficiência renal ou com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, do inglês *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) (Padayatty *et al*, 2010). Um produto final de oxidação ascorbato é o ácido oxálico, que pode cristalizar formando oxalato de cálcio no espaço urinário em doentes com insuficiência renal pré-existente. Por outro lado, a remoção do peróxido de hidrogénio produzido no sangue requer a presença de níveis adequados de GSH que, por sua vez, requer NADPH produzido pela G6PD, a enzima limitante da velocidade da via das pentoses fosfato. Desta forma, concentrações elevadas de ascorbato podem induzir hemólise intravascular

em doentes com deficiência em G6PD (Du *et al*, 2012). A vitamina C pode também aumentar a biodisponibilidade de ferro, pelo que não é recomendado o seu uso em doentes com hemocromatose, doença hereditária caracterizada pela absorção exagerada de ferro (Barton *et al*, 1998). Chen e seus coautores demonstraram que com 75 a 100 g de vitamina C administradas por via i.v., se atingem níveis de ascorbato de 25 mM com segurança que se mantêm por várias horas (Padayatty *et al*, 2004; Chen *et al*, 2008a), concentração esta que é suficiente para induzir morte celular em diferentes células tumorais (Sinnberg *et al*, 2014).

Padayatty e seus coautores examinaram três casos clínicos bem documentados de acordo com as *guidelines* do *NCI Best Case Series*. A análise histopatológica sugeriu um mau prognóstico para estes doentes, contudo a sobrevivência dos doentes aumentou após o tratamento endovenoso com vitamina C. A vitamina C foi administrada entre 15 a 65 g, inicialmente uma ou duas vezes por semana durante vários meses; dois dos doentes receberam as injeções de vitamina C menos frequentemente durante 1 a 4 anos. Estes casos sugerem que uma terapia com elevadas massas de ascorbato i.v. pode prolongar a vida de doentes com cancro avançado (Padayatty *et al*, 2006).

Três ensaios clínicos de fase I com o uso de ascorbato i.v. em doentes com cancro avançado avaliaram as concentrações plasmáticas de ascorbato e as suas consequências clínicas (Du *et al*, 2012). No estudo de Riordan e seus coautores, os doentes foram sujeitos a infusões contínuas de 0,15 a 0,7 g/kg.dia por mais de 8 semanas. As concentrações de ascorbato no soro durante a terapia foram de 0,28 a 3,8 mM (Riordan *et al*, 2005). No estudo de Hoffer e seus coautores, o ascorbato foi administrado três vezes por semana em quantidades fixas de 0,4, de 0,6, de 0,9 e de 1,5 g/kg, permitindo a obtenção de concentrações plasmáticas máximas de ascorbato entre 2,4 e 26 mM. Com a administração i.v. de 1,5 g/kg (equivalente a 105 g para uma pessoa de 70 kg), a concentração plasmática de ascorbato excedeu os 10 mM por aproximadamente 4,5 horas, níveis capazes de induzir morte celular numa variedade de linhas celulares tumorais (Hoffer *et al*, 2008). Num estudo mais recente, Monti e seus coautores administraram 50, 75 ou 100 g/infusão i.v. (três infusões endovenosas por semana) durante 8 semanas, concomitantemente com gencitabina e erlotinib oral. Nos

doentes que receberam 100 g de ascorbato, as concentrações plasmáticas de ascorbato atingiram entre 25 a 32 mM (Monti *et al*, 2012). Os três ensaios clínicos mostraram que as elevadas concentrações de ascorbato i.v. foram bem toleradas pelos doentes oncológicos com função renal normal (Du *et al*, 2012). Outros dois estudos reportaram que o tratamento com vitamina C i.v. resultou na melhoria da qualidade de vida e na diminuição dos efeitos secundários associados à doença oncológica (Yeom *et al*, 2007; Vollbracht *et al*, 2011). Atualmente há cerca de 15 ensaios clínicos de fase inicial, dos quais 8 destes usaram massas superiores a 50 g, e mais estudos observacionais e casos clínicos que usam entre 1 e 125 g por infusão i.v., em que todos eles mostraram boas tolerabilidade e segurança. Algum benefício foi observado nos doentes, com alguma melhoria da qualidade de vida dos doentes, e alguns estudos sugeriram mesmo respostas tumorais (Chen *et al*, 2015a). Contrariamente a outros fármacos sintéticos, a vitamina C não está sujeita a regulamentações, razão pela qual, simultaneamente com a realização de ensaios clínicos, tem sido usada clinicamente, durante décadas, para tratar doentes com cancro (Figura 18).

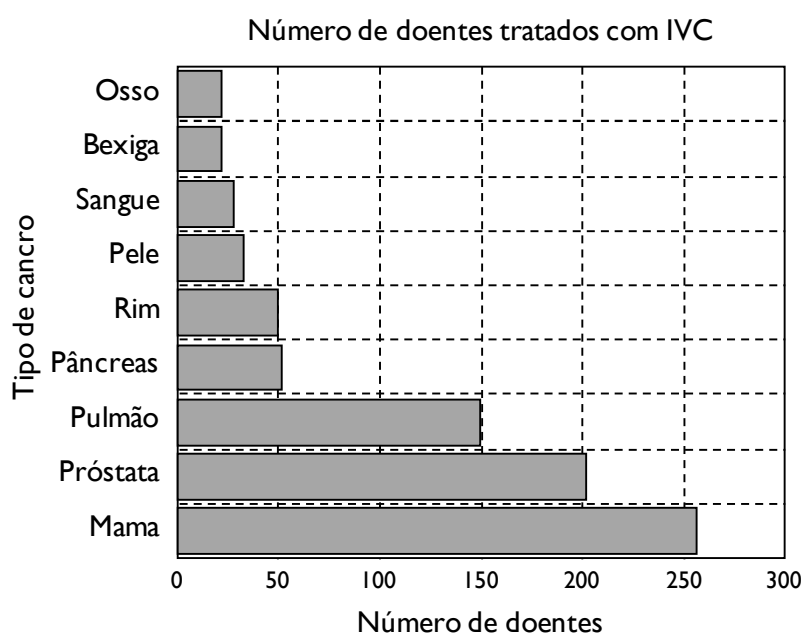


Figura 18: Tipos de cancro tratados com elevadas concentrações de vitamina C via i.v. pela *Riordan Clinic*. Esta base de dados diz respeito a doentes oncológicos para os quais os níveis plasmáticos de AA, de proteína C reativa (marcador de inflamação) e de marcadores de cancro estavam disponíveis, antes e após o tratamento. Adaptado de (Mikirova *et al*, 2013).

A experiência da *Riordan Clinic* sugere que esta terapia é segura e que em alguns casos mostra eficácia e publicou até um protocolo de administração de vitamina C i.v. a doentes oncológicos, *Riordan IVC Protocol*. A *Riordan Clinic* tem tratado centenas de doentes com cancro, usando o protocolo referido (Mikirova *et al*, 2013). Porém, podemos salientar que não há estudos realizados em doentes portadores de carcinoma colorretal. Este facto é alargado a nível dos Estados Unidos da América, sabendo-se que mais de 10 000 doentes por ano são tratados com ascorbato i.v., numa média de 0,5 g/kg (35 g para uma pessoa de 70 kg), e numa média de 20 tratamentos por doente (Chen *et al*, 2015a).

### ***Vitamina C e a terapêutica convencional do cancro***

A literatura reporta que 30 a 95% dos doentes com cancro procuram opções terapêuticas não convencionais, com a intenção de melhorar a sua qualidade de vida e de controlar os sintomas (Ernst & Cassileth, 1998; Richardson *et al*, 2000; Rausch *et al*, 2011).

O interesse no uso de combinações de fármacos tem crescido abruptamente devido às oportunidades que estes modelos criam, em especial o aumento do efeito terapêutico e a redução da frequência ou da magnitude de efeitos secundários indesejáveis, em comparação com o seu uso individual. Combinações de fármacos têm sido conhecidas por serem altamente eficazes no tratamento de várias doenças durante vários anos (Almohaimed & Donev, 2014).

Vários estudos têm avaliado o possível efeito sinérgico do AA com diferentes fármacos usados na quimioterapia convencional (Goodman, 2015). Num regime de combinação, o AA providencia oportunidades adicionais para o aumento da seletividade do tratamento e do efeito terapêutico sobre as células tumorais, com o recurso a menores concentrações de fármaco quimioterapêutico convencional e, por este motivo, potencialmente mais seguras. Estas vantagens traduzir-se-ão na diminuição dos efeitos secundários e na melhoria da qualidade de vida do doente.

Em 1996, *Kurbacher* e seus coautores testaram o efeito combinado do AA com fármacos quimioterapêuticos convencionalmente usados para o tratamento do cancro da mama, nomeadamente, a doxorubicina, a cisplatina e o paclitaxel, em duas linhas celulares de carcinoma da mama humano e verificaram que a presença de AA potenciou a citotoxicidade da quimioterapia (*Kurbacher et al, 1996*). Estudos realizados posteriormente, também em linhas celulares de carcinoma da mama, enfatizaram este facto, na medida em que a utilização de concentrações farmacológicas de ascorbato aumentou a atividade citotóxica do etoposido, da cisplatina, do 5-fluorouracilo, da doxorubicina e do paclitaxel (*Verrax & Calderon, 2009*). *Espey* e seus coautores demonstraram que concentrações farmacológicas de ascorbato em combinação com gencitabina resultaram numa resposta citotóxica sinérgica em linhas celulares de cancro do pâncreas. A eficácia desta combinação foi também testada em xenotransplantes de tumores pancreáticos, tendo-se verificado inibição do crescimento tumoral mais acentuada do que o tratamento com gencitabina em monoterapia (*Espey et al, 2011*). Outro estudo realizado numa linha celular de cancro colorretal mostrou que o tratamento combinado de vitamina C com cisplatina resultou no aumento significativo da apoptose, em comparação com o tratamento apenas com cisplatina. Neste estudo, os autores concluíram que a vitamina C induziu o aumento da sensibilidade das células à cisplatina por uma via dependente da P53 (*An et al, 2011*). Também em 2011, *Vollbracht* e seus coautores avaliaram a segurança e a eficácia da administração de vitamina C por via i.v., no primeiro ano pós-operatório de mulheres com cancro da mama. A comparação de indivíduos controlo com os grupos de estudo revelou que a administração de vitamina C resultou na redução significativa dos efeitos secundários associados à doença e aos tratamentos de quimioterapia e de radioterapia, particularmente, as náuseas, a anorexia, a astenia, a depressão, os distúrbios do sono, as tonturas e a diátese hemorrágica. Para além disso, não foram documentados efeitos secundários resultantes da administração de vitamina C (*Vollbracht et al, 2011*). Um estudo realizado em células primárias de glioblastoma multiforme, um tipo de cancro conhecido pela sua resistência à radiação, mostrou a sua eficaz radiosensibilização pelo uso de concentrações farmacológicas de ascorbato (*Herst et al, 2012*). Outros dois ensaios que tinham como alvo o cancro do pâncreas metastático de estágio IV foram

reportados, ambos usando regimes de ascorbato (50 a 100 g/infusão, 2 a 3 vezes por semana) combinado com gencitabina ou com gencitabina mais erlotinib. Toxicidade foi reportada em ambos os estudos, contudo, predominantemente relacionada com o uso de gencitabina e não com o ascorbato (Monti *et al*, 2012; Welsh *et al*, 2013). No estudo realizado por Monti e seus coautores, 7 dos 9 doentes tiveram redução do volume tumoral após 8 semanas de tratamento e o tempo médio de sobrevivência global foi de 182 dias (Monti *et al*, 2012). Welsh e seus coautores reportaram uma média de sobrevivência de  $13 \pm 2$  meses em 9 doentes tratados com vitamina C, verificando-se um prolongamento da sobrevivência dos doentes em comparação com controlos (Welsh *et al*, 2013). No entanto, ambos os ensaios incluíam um pequeno número de doentes e não foram prospectivamente controlados (Chen *et al*, 2015a). Em 2013, Moser e seus coautores demonstraram o efeito radiosensibilizante do ascorbato, presente em concentrações farmacológicas, em tumores do pâncreas radorresistentes, tendo ainda sido estabelecida uma correlação entre a toxicidade do ascorbato e o aumento dos níveis de ferro lábil (Moser *et al*, 2013). Em 2015, Du e seus coautores mostraram ainda que o ascorbato administrado em combinação com a radiação ionizante, em modelos de xenotransplantes hetero e ortotópicos de tumores pancreáticos, diminuiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevivência sem danificar o trato gastrointestinal ou aumentar as alterações sistémicas indicativas de stresse oxidativo (Du *et al*, 2015a). O caso clínico de uma mulher com cancro da mama recorrente, submetida a tratamentos semanais de quimioterapia e com letargia como principal efeito secundário, foi sujeita a administrações de vitamina C (50 g/sessão, 2 vezes por semana). Os autores deste relatório reportaram a diminuição dramática da astenia e das insónias, assim como, o aumento da função cognitiva, sem registo de quaisquer efeitos adversos inerentes ao uso de vitamina C i.v. (Carr *et al*, 2014). Um outro estudo mais completo de Ma e seus coautores mostrou que a combinação de ascorbato parental com fármacos quimioterapêuticos convencionais (carboplatina e paclitaxel) atuou sinergicamente na inibição tumoral em modelos animais de cancro do ovário e reduziu a toxicidade associada à quimioterapia em doentes com cancro do ovário (Ma *et al*, 2014).

Jacobs e seus coautores fizeram recentemente uma cuidada revisão sistemática da literatura para avaliar os efeitos anti-tumorais e a toxicidade do tratamento com



elevadas concentrações de ascorbato. Apesar de todas as evidências pré-clínicas existentes, a escassez de estudos randomizados e controlados, bem como a heterogeneidade clínica e metodológica da literatura disponível, foram algumas das limitações encontradas pelos autores que dificultaram a confirmação das evidências do potencial da vitamina C no tratamento do cancro (Jacobs *et al*, 2015). Esta é a razão pela qual parte da comunidade médica mantém um certo ceticismo relativamente ao uso de concentrações elevadas de vitamina C i.v. no tratamento do cancro. Por esta razão, vários autores reconhecem a necessidade imperativa do prosseguimento dos estudos pré-clínicos, que esclareçam os mecanismos de ação envolvidos em diferentes tipos de tumores, e de novos ensaios clínicos bem desenhados e randomizados, que estabeleçam de forma clara e cientificamente robusta os benefícios e/ou os malefícios desta terapia (Ohno *et al*, 2009; Du *et al*, 2012; Wilson *et al*, 2014; Goodman, 2015).

A comunidade científica mantém-se interessada nesta temática, pelo que estão atualmente a decorrer quatro ensaios clínicos de fase II financiados pelo *National Cancer Institute*, para avaliação do efeito de elevadas concentrações de vitamina C administradas por via i.v. no tratamento de vários tipos de cancro. Dois destes ensaios clínicos em curso pretendem avaliar a combinação de AA com gencitabina e/ou erlotinib no tratamento de doentes com cancro do pâncreas metastático (NCI-2012-00340) ou com cancro do pâncreas não elegível para cirurgia (NCI-2014-00824). Outro ensaio clínico pretende avaliar a combinação de docetaxel com AA no tratamento de cancro da próstata metastático (NCI-2015-01169); e, por fim, outro ensaio clínico está a ser conduzido com elevadas concentrações de vitamina C i.v. em doentes com cancro do pulmão de não-pequenas células nos estádios IIIB-IV (NCI-2015-00709) (Institute, 2016).



## CAPÍTULO III – OBJETIVOS

O cancro colorretal avançado é uma entidade nosológica de difícil tratamento, pelo que novas abordagens de tratamento eficazes são indispensáveis. Uma dessas abordagens passa pelo estabelecimento de regimes eficazes de combinação de fármacos. Durante os últimos anos, os efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente, seletivamente citotóxicos de elevadas concentrações de vitamina C, para as células tumorais têm sido investigados em maior detalhe, tanto em modelos *in vitro* como em modelos animais de cancro e em ensaios clínicos. Contudo, a escassez de estudos com vitamina C em modelos de cancro colorretal faz denotar a necessidade da prossecução deste tema de investigação.

De uma forma geral, o principal objetivo do nosso trabalho consistiu na avaliação do potencial da vitamina C, na forma de AA, no tratamento do cancro colorretal.

Numa primeira fase, pretendeu-se avaliar o efeito de elevadas concentrações de AA em três linhas celulares de cancro colorretal humanas. Por isto, estudaram-se os seus efeitos anti-proliferativos, citotóxicos e genotóxicos. Alterações a nível do stresse oxidativo e da expressão de proteínas-chave foram também analisadas, com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos de ação do AA nestas linhas celulares.

A sinergia entre a vitamina C e alguns fármacos de quimioterapia convencional usados para o tratamento do cancro colorretal poderá contribuir para o estabelecimento de protocolos de tratamento mais eficazes, com concentrações reduzidas, podendo diminuir os efeitos secundários. Deste modo, na segunda parte do

trabalho pretendemos avaliar o efeito quimiossensibilizante do AA em combinação com três desses fármacos: o 5-FU, a oxaliplatina e o irinotecano. Ainda num contexto pré-clínico, este capítulo do trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito do AA num modelo animal de cancro colorretal, em regime de monoterapia e em combinação com os três fármacos descritos anteriormente.

**PARTE II**

**TRABALHO EXPERIMENTAL**



## **CAPÍTULO IV – VITAMINA C E SEU MECANISMO ANTI-TUMORAL**

Vários autores têm demonstrado o potencial terapêutico do ácido ascórbico em diversas linhas celulares tumorais de diferentes tipos de cancro (Ranzato *et al*, 2011; Kontek *et al*, 2013; Mastrangelo, 2013; Mastrangelo *et al*, 2013; Ma *et al*, 2014). Nesta parte do trabalho pretendeu-se estudar o seu efeito citotóxico em três linhas celulares de cancro colorretal com diferentes perfis genéticos e localização de origem (Abrantes *et al*, 2014), com recurso a várias técnicas de biologia celular e molecular seguidamente descritas.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este capítulo visa apresentar a descrição de todas as metodologias necessárias à concretização dos estudos *in vitro*, a partir dos quais se avaliou o efeito do ácido ascórbico na célula tumoral de cancro colorretal. Iniciámos com o estudo do seu efeito citotóxico e respetivo mecanismo de ação até à análise da sua farmacocinética e dos transportadores envolvidos.

## Cultura das linhas celulares

Para a realização deste trabalho utilizaram-se três linhas celulares humanas de cancro colorretal, designadas por C2BBel (ATCC<sup>®</sup> CRL-2102<sup>™</sup>), LS1034 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2158<sup>™</sup>) e WiDr (ATCC<sup>®</sup> CCL-218<sup>™</sup>). Todas as linhas celulares usadas estão certificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC).

A linha celular C2BBel foi clonada por diluição limitante da linha celular Caco-2, a qual foi isolada do cólon descendente de um doente caucasiano de 72 anos com adenocarcinoma colorretal (ATCC). Os critérios de seleção deste clone incluíram a sua homogeneidade morfológica e a localização apical exclusiva de vilina (Straub *et al*, 2013). As células epiteliais humanas C2BBel formam uma monocamada polarizada com bordadura em escova na zona apical, morfológicamente comparáveis ao cólon humano (Masuda *et al*, 2011).

A linha celular LS1034 foi isolada em 1989 de uma biópsia do tumor primário de um doente caucasiano de 54 anos, diagnosticado com um carcinoma do cego no estágio C, segundo a classificação de *Dukes* (ATCC). As células epiteliais humanas LS1034 possuem mutações nos genes supressores tumorais *TP53* (com troca de glicina por serina na posição 245) e *APC* (com deleção no códon 1309). Esta linha celular caracteriza-se também por ser resistente à quimioterapia, facto associado à sobre-expressão da proteína de efluxo glicoproteína-P (PGP, do inglês *P-glycoprotein*) (Casalta-Lopes *et al*, 2011).

A linha celular WiDr provém de um adenocarcinoma do cólon (ATCC), de localização reto-sigmoide (Abrantes *et al*, 2014), diagnosticado a uma doente de 78 anos. Estas células epiteliais humanas possuem o gene *TP53* mutado (com consequente troca de arginina por histidina na posição 273 da proteína P53). À semelhança das linhas celulares supracitadas, as células WiDr possuem também o gene *APC* mutado (Ilyas *et al*, 1997).

As linhas celulares utilizadas foram devidamente rececionadas e oportunamente



descongeladas e mantidas a 37 C em atmosfera humificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com as instruções do fornecedor ATCC. Estas foram propagadas em meio de cultura apropriado *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130) para a linha celular LS1034, e *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648) para as linhas celulares C2BBel e WiDr. Ambos foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*; Sigma F7524), 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Sigma, A5955), e 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) para o RPMI ou 0,25 mM no caso do DMEM.

Atendendo a que todas as linhas celulares utilizadas no âmbito deste trabalho são mantidas em cultura aderente, foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para tal recorreu-se ao uso de uma solução de tripsina-EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) a 0,25% (Sigma, T4049) no caso das células WiDr, ou *TrypLE™ Express* (Gibco, 12605-028) no caso das células C2BBel e LS1034, para a dissociação da monocamada celular. Após a obtenção da suspensão celular procedeu-se à determinação da concentração de células da mesma, pelo método de exclusão do azul tripano. Para tal diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e, utilizando uma câmara de *neubauer*, fez-se a contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 100 vezes.

## Tratamento com ácido ascórbico

Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de 2 M de ácido ascórbico (AA, Sigma, A5960) que, previamente à sua utilização, foi filtrada utilizando filtros de acetato celulose de 0,22 µm (*Syringe Filter*, Frilabo, 1520012). Previamente à administração às células, foram preparadas soluções de AA por diluição da solução original, de forma que o volume a adicionar às culturas fosse, no máximo, 1% do volume do meio de cultura presente em cada poço ou frasco. Este procedimento foi aplicado em todos os métodos descritos.

Na Tabela 3 apresentam-se as concentrações de ácido ascórbico testadas para

cada ensaio experimental. A diferença de concentrações de AA usadas para diferentes ensaios prendeu-se com a sensibilidade de cada linha celular ao AA, tendo por base os valores de  $IC_{50}$  (concentração inibitória média) após 24 horas de incubação, após a realização do ensaio SRB (do inglês *sulforhodamine B*), descrito posteriormente. Para cada tipo de estudo houve uma condição controlo e várias condições experimentais que corresponderam à utilização de diferentes concentrações de ácido ascórbico. As células controlo (condições 1, 5, 9 e 13) não foram sujeitas a qualquer tratamento. Nas restantes condições, as células foram tratadas com uma concentração de AA inferior à  $IC_{50}$  (condições 2, 6 e 10), aproximadamente igual à  $IC_{50}$  (condições 3, 7, 11 e 14) ou superior à  $IC_{50}$  (condições 4, 8, 12 e 15) obtida para cada linha celular. Devido a limitações experimentais, relacionadas por exemplo com a quantidade de proteína total obtida, as máximas concentrações testadas variaram de acordo com o ensaio experimental.

Tabela 3: Concentrações de AA (mM) testadas nas linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr em cada ensaio experimental.

<b>Ensaio Experimental</b>	<b>Condição</b>	<b>C2BBel</b>	<b>LSI034</b>	<b>WiDr</b>
<i>Ensaio Clonogénico</i>	1	0	0	0
	2	0,5	1	0,5
	3	2	5	2
	4	5	20	5
<i>Citometria de Fluxo e Análise Morfológica</i>	5	0	0	0
	6	0,5	1	0,5
	7	1	5	2
	8	10	20	10
<i>Western Blot</i>	9	0	0	0
	10	0,5	1	0,5
	11	1	5	2
	12	5	10	5
<i>Ensaio Cometa</i>	13	0	0	0
	14	1	5	2
	15	3	10	5

## Citotoxicidade do ácido ascórbico

Com o intuito de compreender o papel do AA no tratamento do cancro colorretal, como primeira abordagem realizaram-se estudos de citotoxicidade celular.

### **Análise da proliferação celular pelo ensaio SRB**

Para avaliar a influência do AA na proliferação celular, células das três linhas celulares tumorais foram semeadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL (C2BBel e WiDr) ou de  $7 \times 10^4$  células/mL (LS1034) e tratadas com concentrações crescentes de AA (0,25 a 20 mM), durante 24, 48, 72 e 96 horas. As células controlo não foram sujeitas a qualquer tratamento.

A proliferação celular, como medida da síntese proteica total, foi posteriormente analisada pelo ensaio colorimétrico do SRB. O princípio deste ensaio baseia-se na capacidade do corante aminoxantina, carregado negativamente, se ligar eletrostaticamente e de forma dependente do pH aos componentes proteicos das células previamente fixadas (Voigt, 2005). Desta forma, quanto maior a síntese proteica, maior a densidade celular e, conseqüentemente, maior a quantidade de corante extraído, o que se traduzirá na maior absorvância medida no espectrofotómetro (Vichai & Kirtikara, 2006; Houghton *et al*, 2007).

Após o respetivo tempo de exposição ao AA, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*), constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, S5011) e 1,8 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, P0662), a pH 7,4. Após o PBS ser aspirado, repetiu-se o procedimento para assegurar a retirada de todo o composto. Seguidamente, as células foram fixadas com uma solução gelada de ácido acético a 1% (Sigma, 33209) em metanol (Sigma, 32213), e mantidas a 4°C durante uma hora. Após este período a solução de fixação foi aspirada e adicionaram-se 100 µL/poço de uma solução de SRB a 0,4% (Sigma, S9012) em ácido acético a 1%. As células foram incubadas

durante uma hora à temperatura ambiente e protegidas da luz. O corante em excesso e não ligado foi removido por lavagem com água. Depois das placas de cultura secarem por completo, adicionaram-se 300 µL/poço de uma solução de Tris.NaOH na concentração de 10 mM e com pH de 10, constituída por trizma base e NaOH. Após dissolução e homogeneização, transferiu-se o conteúdo de cada poço para uma placa de 96 poços e quantificou-se a absorvância, usando o comprimento de onda de 540 nm e um filtro de referência de 690 nm, com recurso a um espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

A proliferação celular foi expressa como a percentagem de proliferação das culturas submetidas ao tratamento em relação às culturas controlo. Os dados percentuais obtidos permitiram estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração de AA que inibe em 50% a proliferação celular ( $IC_{50}$ ), com recurso ao software OriginPro 8.0.

### ***Análise da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico***

Para avaliar a sobrevivência celular após exposição ao ácido ascórbico durante 24 horas recorreu-se ao ensaio clonogénico. Para tal, as três linhas celulares tumorais foram semeadas numa densidade de 500 células/poço (C2BBe1 e WiDr) ou de 700 células/poço (LS1034) em placas de 6 poços e tratadas com concentrações crescentes de AA, de acordo com a Tabela 3 (condições 1 a 4).

O ensaio clonogénico baseia-se na capacidade de uma célula semeada numa placa de cultura com meio apropriado formar um clone ou uma colónia, tendo por base que uma colónia é constituída por, pelo menos, cinquenta células (Franken *et al*, 2006). Assim, após o tratamento das culturas com o ácido ascórbico, estas foram incubadas em condições favoráveis para a sua propagação, trocando-se o meio de cultura por meio novo após cinco dias de incubação. Doze dias depois do tratamento, as colónias foram coradas com violeta de cristal e contadas manualmente. Para tal, o meio foi removido e as células lavadas com PBS e fixadas com metanol. Após secagem das placas

adicionaram-se 2 mL/poço de corante violeta de cristal a 0,5% (Sigma, C3886) diluído em metanol e deixou-se atuar durante 5 minutos. O excesso de corante foi seguidamente removido por lavagem das placas em água tépida e, após secagem, o número de colónias foi contado. A sobrevivência celular foi quantificada através da determinação da eficiência de placa (PE) e do fator de sobrevivência (FS), segundo as equações 1 e 2.

$$\text{Eficiência da placa (PE)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Fator de sobrevivência (FS)} = \frac{\text{PE das amostras tratadas}}{\text{PE das amostras controlo}} \times 100 \quad (2)$$

### **Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo**

O efeito do ácido ascórbico na progressão do ciclo celular foi avaliado com recurso à citometria de fluxo, pela marcação com uma solução de iodeto de propídeo (IP)/RNase. As células foram semeadas e tratadas com concentrações crescentes de AA, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8), durante 24 horas.

Como supracitado, o IP tem a capacidade de se intercalar nas bases de DNA e de RNA. Assim, para se obter uma especificidade de marcação para o DNA é necessário remover o RNA de forma enzimática, pela incubação com RNase. A quantificação do conteúdo de DNA permite obter subpopulações de células em cada uma das fases do ciclo celular, uma vez que as células nas fases G2 e M possuem o dobro do conteúdo de DNA do que as células nas fases G0 e G1, enquanto as células na fase S possuem um conteúdo de DNA intermédio. É ainda possível a visualização de um pico pré-G0 com menor quantidade de DNA, também designado por pico apoptótico (Deitch *et al*, 1982; Williams & Stoeber, 2012).

Para cada ensaio, um milhão de células foram destacadas dos frascos e centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, numa centrífuga *Heræus* (modelo Multifuge I<sub>L-R</sub>, Kendro Laboratory Products, Alemanha) refrigerada a 4°C. Para fixar as células, adicionaram-se ao sedimento em agitação, 200 µL de etanol a 70% e incubaram-se

durante 30 minutos na ausência de luz e a 4°C. Depois de nova centrifugação a 1300 xG, durante 5 minutos, lavaram-se as células com 2 mL de PBS e ao *pellet* resultante adicionaram-se 500 µL da solução de IP/RNase (Immunostep, *PI/RNase*). Após incubação durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente, foi feita a detecção utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 640 nm. Os resultados foram representados como histogramas de intensidade de fluorescência (Figura 19) e quantificados com recurso ao *software* ModFit LT™, Verity, Software House. Os dados obtidos foram expressos em percentagem de células em cada uma das subpopulações: pré-G0/G1, G0/G1, S e G2/M.

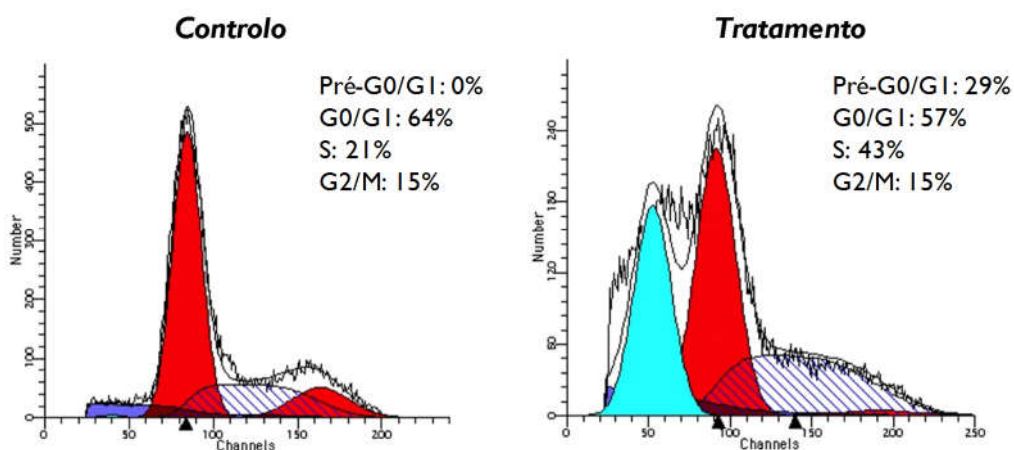


Figura 19: Histogramas de intensidade de fluorescência exemplificativos obtidos por citometria de fluxo, para avaliação das alterações do ciclo celular em células controlo e em células tratadas. A marcação com IP/RNase permite distinguir subpopulações de células em cada uma das fases do ciclo celular, nomeadamente G0/G1, S e G2/M, para além do pico pré G0/G1, também designado por pico apoptótico.

### **Análise da viabilidade e mecanismos de morte celular**

Tem sido demonstrado que concentrações farmacológicas de ácido ascórbico induzem morte celular em vários tipos de cancro pelo aumento do stress oxidativo (Cullen, 2010; Olney *et al*, 2013), contudo sabe-se também que o efeito citotóxico do AA pode ser mediado por outras vias (Wilson *et al*, 2014). Desta forma, primeiramente foram avaliados a viabilidade celular e os tipos de morte celular. Posteriormente, com o intuito de caracterizar as vias de morte celular induzidas por concentrações elevadas de

AA vários parâmetros foram analisados. Destes destacamos a expressão de BAX (do inglês *BCL-2 associated X protein*) e de BCL-2, as alterações do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e do stresse oxidativo e a expressão de PGP que foram avaliadas por citometria de fluxo, a expressão de caspase-8, de caspase-9, de P53 e de VEGF que foram avaliadas por *western blot*, e as lesões no DNA que foram avaliadas pelo ensaio cometa. O ensaio SRB, já referido, foi também utilizado para averiguar as alterações no stresse oxidativo.

#### *Análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo e microscopia ótica*

A viabilidade e a morte celulares foram avaliadas com recursos às técnicas de citometria de fluxo e análise morfológica por microscopia ótica. Para avaliar o efeito do ácido ascórbico na viabilidade e na indução de morte das três linhas celulares tumorais em estudo, estas foram semeadas e tratadas, durante 24 horas, com concentrações crescentes de AA, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8).

Primeiramente, a avaliação da viabilidade e do tipo de morte celular foi efetuada por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V (AV) marcada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e IP. Este procedimento permite distinguir as células viáveis, as células mortas por apoptose inicial e as células mortas por apoptose tardia e/ou necrose. Uma das alterações decorrentes do processo apoptótico é a alteração da arquitetura da membrana plasmática, com a redistribuição de várias espécies fosfolipídicas. Entre estas, encontra-se a fosfatidilserina que na célula viável está presente no folheto interno da membrana celular. Quando uma célula morre por apoptose, a fosfatidilserina sofre translocação do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Desta forma, a elevada afinidade da AV para fosfolípidos de carga negativa como a fosfatidilserina, torna-a um potente discriminador entre células viáveis e células apoptóticas (Vermees *et al*, 2000; Chen *et al*, 2008b). Por sua vez, a rutura da membrana plasmática, característica de células em necrose ou em fases mais avançadas da apoptose, permite a entrada de IP para o meio intracelular, o qual se intercala no DNA e emite

fluorescência (Abrantes *et al*, 2010). Assim, a dupla marcação permite distinguir quatro populações de células: a população de células vivas, negativas para ambas as marcações; a população de células em apoptose inicial, positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para a marcação com o IP; a população de células em apoptose tardia/necrose, positivas para ambas as marcações; e a população de células em necrose, negativas para a marcação com AV-FITC e positivas para a marcação com o IP (Vermes *et al*, 2000).

Para a execução desta avaliação, foram destacadas dos frascos um milhão de células por ensaio. As suspensões celulares foram seguidamente centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, e os *pellets* obtidos ressuspensos em 1 mL de PBS. Seguidamente, efetuou-se nova centrifugação e incubou-se o sedimento em 100 µL de tampão de ligação frio, constituído por 0,01 M de HEPES (Sigma, H7523), 0,14 M de NaCl e 0,25 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma, C4901), e 2,5 µL de AV-FITC (Immunostep, ANXVKF) e 1 µL de IP (Immunostep, ANXVKF) durante 15 minutos, protegido da luz e à temperatura ambiente. Por último, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação frio. A deteção foi feita num citómetro FACSCalibur, usando os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e os comprimentos de onda de emissão de 530 nm para a AV-FITC e de 640 nm para o IP. Os resultados foram expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações, tal como evidenciado na Figura 20.

Paralelamente, os tipos de morte celular induzida pelo AA foram igualmente caracterizados morfológicamente com recurso à coloração *May-Grünwald-Giemsa*. Para tal, 20x10<sup>4</sup> células por ensaio foram destacadas dos frascos. As suspensões celulares foram seguidamente centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, e os *pellets* obtidos ressuspensos em 50 µL de FBS. Seguidamente, 20 µL da suspensão celular foram colocados na superfície de uma lâmina, e o esfregaço feito fazendo deslizar outra lâmina sobre esta. Posteriormente, os esfregaços de cada lâmina foram corados com 1,5 mL de solução de *May-Grünwald* (Sigma, MG500; 0,3% v/v em metanol) durante 3 minutos. Após lavagem com 1,5 mL de água durante 1 minuto, adicionaram-se 2,5 mL de solução de *Giemsa* (Sigma, GS500; 0,75% p/v em glicerol:metanol, 1:1) durante 15 minutos. Após a coloração, retirou-se o excesso de corante com nova lavagem com água tépida e deixaram-se secar à temperatura ambiente. As lâminas foram visualizadas num



microscópio *Nikon Eclipse 80i* equipado com câmara digital *Nikon DXm 1200 F* para análise da morfologia celular.

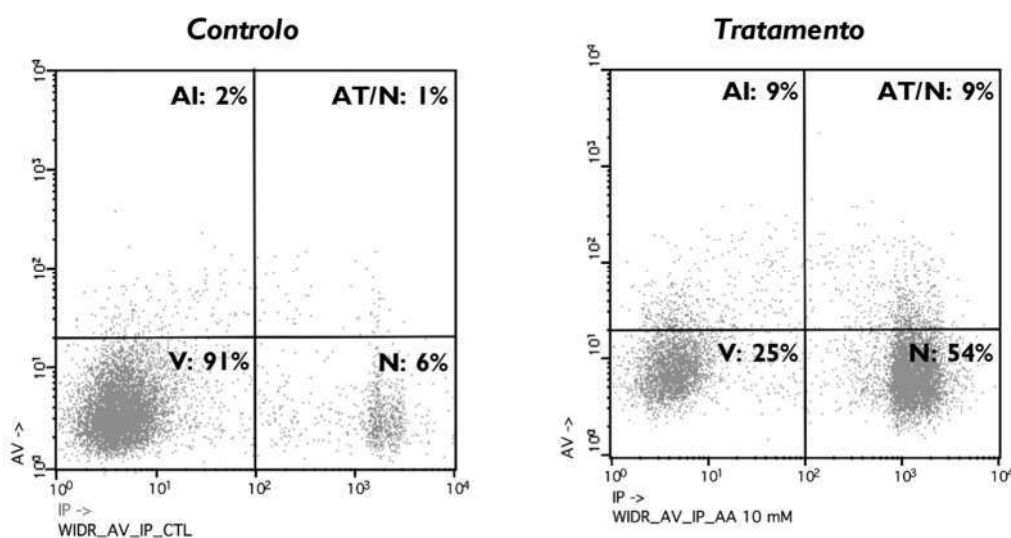


Figura 20: Histogramas de intensidade de fluorescência exemplificativos obtidos por citometria de fluxo, para avaliação da viabilidade e dos tipos de morte celular induzidos em células controlo e em células tratadas. A dupla marcação com AV e IP permite distinguir quatro populações de células: células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e células em necrose (N).

### *Análise da expressão de BAX e BCL-2 por citometria de fluxo*

Após análise do efeito do ácido ascórbico sobre a viabilidade celular, estudou-se o seu efeito na expressão das proteínas BAX e BCL-2, recorrendo à citometria de fluxo. Para tal, as células foram semeadas e tratadas, durante 24 horas, com concentrações crescentes de AA, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8).

Para cada ensaio um milhão de células foram destacadas dos frascos e centrifugadas a 1300 xG, durante 5 minutos. As células foram posteriormente fixadas com 100 µL de solução de fixação (Immunostep, *Intracell Kit*) durante 15 minutos, protegidas da luz e à temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS, e sujeitas a centrifugação nas mesmas condições (1300 xG, 5 minutos). Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi incubado com 100 µL de solução de permeabilização (Immunostep, *Intracell Kit*), 0,6 µg de anticorpo anti-BAX-PE (Santa Cruz

Biotechnology, sc-20067 PE) e 0,6 µg de anticorpo anti-BCL2-FITC (Santa Cruz Biotechnology, sc-509 FITC), durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionaram-se 2 mL de PBS e centrifugou-se a suspensão a 1300 xG durante 5 minutos. Por fim, ressuspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS. A detecção foi realizada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 585 nm para a BAX e de 530 nm para a BCL-2. Os dados obtidos foram expressos como a razão da média das intensidades de fluorescência (MIFs) da BAX e da BCL-2, com normalização ao controlo.

### *Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo*

O potencial de membrana mitocondrial foi medido com a utilização da sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide). O JC-1 é um corante lipofílico e catiónico que entra na mitocôndria na forma de monómeros (M) e que, em condições de polarização da mitocôndria, forma agregados (A) que emitem fluorescência no vermelho. Com a diminuição do  $\Delta\psi_m$ , o JC-1 é excluído da mitocôndria e dispersa-se no citoplasma na forma de monómeros que emitem fluorescência no verde. A razão entre a fluorescência verde e vermelha (M/A) dá-nos uma estimativa do  $\Delta\psi_m$ , independentemente da massa mitocondrial (Yao *et al*, 2008; Mamede *et al*, 2012b).

Para a realização deste ensaio, as três linhas celulares em estudo foram semeadas e tratadas, durante 24 horas, com concentrações crescentes de AA, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8). Após exposição ao AA, suspensões celulares com um milhão de células em 1 mL de PBS foram incubadas com JC-1 (Sigma, T4069) numa concentração de 5 mg/mL, durante 15 minutos e à temperatura de 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, sujeitas a centrifugação a 1300 xG durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µL de PBS. A análise no citómetro de fluxo foi realizada com recurso aos comprimentos de onda de excitação de 590 nm para os agregados e de 530 nm para os monómeros. Os resultados foram representados como a variação da razão das intensidades de fluorescência de monómeros/agregados (M/A), relativamente ao controlo.

### *Análise da expressão de caspase-8 e -9 por western blot*

Para avaliar a implicação das caspases na morte celular induzida pelo ácido ascórbico, utilizou-se a técnica de *western blot*, que permite detetar proteínas específicas numa determinada amostra de homogeneizado de tecido ou extrato celular. Assim, as células foram semeadas e tratadas, durante 24 horas, com concentrações crescentes de AA, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 9 a 12).

Para a preparação dos extratos proteicos, após três lavagens com PBS, foram adicionados aos frascos de cultura 100 µL de solução de lise RIPA (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) composto por 150 mM de NaCl, 50 mM de trizma base (Sigma, T1503), 5 mM de ácido tetracético etileno glicol (EGTA, do inglês *ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*; Sigma, E4378), 1% de Triton® X-100 (Merck, K34979403), 0,5% de desoxicolato de sódio e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecil sulfate*; Sigma, 436143), suplementado imediatamente antes da sua utilização com um cocktail de inibidores de proteases (*cOmplete-Mini*; Roche, 11836153001), de acordo com as indicações do fornecedor e 1 mM de DTT (*DL-dithiothreitol*; Sigma, D9779). Com a ajuda de um “raspador” soltaram-se as células da superfície do frasco e colocou-se o conteúdo num microtubo *eppendorf*®. Após agitação no vórtex, as amostras foram repetidamente submetidas a sonicação com uma amplitude de 35% durante 3 segundos, com recurso a um sonicador *VibraCell* (modelo VC50, Sonic and Materials Inc., EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000 xG e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos *eppendorf*® devidamente identificados que foram guardados a -80°C.

A determinação da quantidade da proteína total foi efetuada pelo método de BCA (Pierce, *BCA™ protein assay kit*). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante, constituída por 60 mM de trizma base, 2% de SDS, 10% de glicerol (Sigma, G2025), 5% de 2-mercaptoetanol (Merck, 444203) e 0,01% de azul de bromofenol.

Após a desnaturação, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de acrilamida. Os géis de acrilamida (Nzytech, MBI5601) foram polimerizados e

colocadas as amostras e o padrão de pesos moleculares (Nzytech, MB09002). Procedeu-se de seguida à eletroforese utilizando um tampão apropriado (*Tris/Glycine/SDS Buffer*, Bio-Rad, 161-0772) com as condições de tempo e de diferença de potencial de acordo com a proteína a detetar. Para a caspase-8 a eletroforese decorreu durante 10 minutos a 100 V seguida de 1 hora e 25 minutos a 160 V enquanto para a caspase-9 decorreu durante 10 minutos a 100 V seguida de 1 hora e 30 minutos a 150 V. Posteriormente, os géis foram colocados em contacto direto com membranas de PVDF (do inglês *polyvinylidene difluoride*, Immobilon, IPVH00010) previamente ativadas em metanol. O sistema de transferência em meio húmido foi preparado e a reação ocorreu sob uma diferença de potencial de 100 V, em tampão com uma concentração de 100 mM de CAPS (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*; Sigma, C2632) com pH acertado a 11. Terminada a transferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com uma solução de TBST-BSA (TBST, do inglês *tris-buffered saline tween-20* e BSA, do inglês *bovine serum albumin*) a 4%, constituída por 20 mM de trizma base, 0,137 mM de NaCl e 0,1% de *Tween 20* (Acros Organics, 233360010) com 5% de BSA (Nzytech, MB04602), à temperatura ambiente. Cerca de uma hora depois, incubaram-se as membranas durante a noite com os anticorpos primários anti-caspase-8 (Immunotech, FLICE, PN IM3148) e anti-caspase-9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8355), diluídos na proporção 1:200 em solução de TBST-BSA, a 4°C e sob agitação constante. No dia seguinte efetuaram-se lavagens com TBST a 1% e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado, *goat anti-mouse* (GE Healthcare, RPN5781) para a caspase-8, ou *goat anti-rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2007) para a caspase-9, diluídos de 1:10 000 em solução de TBST-BSA a 4%, sob agitação constante e à temperatura ambiente durante 1 hora. Após sucessivas lavagens, as membranas foram depois incubadas com o substrato enzimático (*ECF Western Blotting Reagent*, GE Healthcare, RPN5785) durante aproximadamente 2 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000). Para permitir a normalização de cada condição à quantidade de proteína, as membranas foram posteriormente incubadas com o anticorpo anti-actina (Sigma, A5441) diluído de 1:10 000, e a imunodeteção feita de forma semelhante ao já descrito.

O *software ImageQuant 5.0* (Molecular Dynamics, EUA) foi utilizado para o processamento das imagens obtidas, tendo-se traçado regiões de interesse

correspondentes às bandas com o peso molecular expectável das proteínas em questão, nomeadamente de 55 kDa para a caspase-8, de 46 kDa para a caspase-9 e de 35 kDa para um produto de clivagem da caspase-9. O mesmo procedimento foi efetuado para as bandas de actina, com posterior cálculo da razão entre a intensidade da banda das proteínas de interesse e a respetiva intensidade da banda de actina (42 kDa).

### *Análise das lesões no DNA pelo ensaio cometa*

As lesões no DNA induzidas pelo ácido ascórbico foram avaliadas com recurso à eletroforese em microgel de agarose, técnica também denominada por ensaio cometa. Realizada em condições alcalinas esta técnica permite obter informações acerca de lesões em uma única cadeia do DNA (Olive & Banáth, 2006). Neste ensaio, células sem lesões no DNA formam uma esfera densa e compacta sem arrastamento de fragmentos, enquanto as células cujo DNA esteja danificado com quebras ao longo das cadeias, quando lhes é aplicada uma diferença de potencial, formam uma cauda, composta pelos fragmentos de DNA negativamente carregados que migram para o ânodo durante a eletroforese. O tamanho e a forma da cauda formada permitem estimar a extensão das lesões causadas de forma semi-quantitativa (Collins, 2004; Olive & Banáth, 2006).

As lesões no DNA foram avaliadas após submeter as linhas celulares tumorais em estudo a tratamento com ácido ascórbico, durante 24 horas, nas concentrações descritas na Tabela 3 (condições 13 a 15). Nestes ensaios experimentais foram usados dois controlos: culturas celulares em que não houve administração de qualquer composto (condições 13) correspondentes ao controlo negativo e culturas celulares tratadas apenas com peróxido de hidrogénio, na concentração de 20 nM, durante 15 minutos a 4°C, como controlo positivo.

Depois de decorrido o tempo de exposição ao ácido ascórbico, destacaram-se as células dos frascos, contaram-se e centrifugaram-se a 1300 xG, durante 5 minutos. Seguidamente, estas foram ressuspensas em PBS de forma a obter suspensões celulares com 50 000 células/mL. Lâminas de vidro StarFrost® (26x76mm) foram revestidas com

uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal a 1% (Sigma, A2790). Após solidificação, preparou-se uma solução de agarose de baixo ponto de fusão a 1% (Sigma, A9414) e num microtubo *eppendorf*<sup>®</sup> adicionaram-se iguais proporções (v/v) da suspensão celular previamente preparada e da agarose de baixo ponto de fusão. Após homogeneização desta solução, espalhou-se 1 mL sobre as lâminas previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal e cobriu-se com uma lamela. Seguidamente, para solidificar, as lâminas foram colocadas a 4°C durante 30 minutos. Depois de retiradas as lamelas, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4°C com a solução de lise alcalina, preparada de fresco, constituída por 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA (Sigma, E4884), 10 mM de trizma base, 10% de DMSO (do inglês *dimethyl sulfoxide*, Sigma, D4540) e 1% de Triton<sup>®</sup> X-100. As lâminas foram, posteriormente, submersas durante uma hora em tampão de eletroforese, constituído por 300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA com pH de 13,2. Após o tempo de equilíbrio, realizou-se a eletroforese durante 15 minutos com uma diferença de potencial de 25 V e corrente de 1 A. Terminada a eletroforese, seguiu-se a neutralização numa solução de 0,4 M de Tris.HCl durante 15 minutos, com substituição da solução de neutralização a cada 5 minutos. As lâminas foram coradas com brometo de etídio (Bio-Rad, 161-0433) na concentração de 25 µg/mL, durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. De seguida, as lâminas foram lavadas com água ultra-pura para remoção do excesso de corante. A aquisição das imagens foi feita num microscópio de fluorescência invertido com uma ampliação de 250x, utilizando um filtro de excitação a 546 nm com uma lâmpada de mercúrio com uma potência de 100 W, com a emissão de fluorescência monitorizada para um comprimento de onda de 580 nm no refletor com um filtro de comprimento de onda de 590 nm. A obtenção das imagens foi efetuada com recurso ao *software* Motic Images versão 2.0 (Microscope World) e a análise dos cometas com o *software* TriTek CometScore<sup>™</sup> Freeware v1.5. Para a análise dos cometas o programa permite avaliar o grau de lesão no DNA com base em diferentes parâmetros, dos quais se selecionou o momento da cauda, o qual representa o produto entre a percentagem de DNA presente na cauda e o comprimento da cauda do cometa.

### *Análise do stresse oxidativo por citometria de fluxo e pelo ensaio SRB*

Com o intuito de analisar o ambiente redox após exposição das linhas celulares tumorais ao ácido ascórbico, vários parâmetros que influenciam o stresse oxidativo foram avaliados, nomeadamente, a produção intracelular de ROS, em particular de radical superóxido e de peróxidos, e das defesas antioxidantes GSH e SOD. Para além disso, na impossibilidade de avaliação da concentração intracelular específica de peróxido de hidrogénio e de radical hidroxilo, realizaram-se estudos na presença de inibidores destas duas ROS. Neste âmbito, foi também avaliada a sensibilidade das três linhas celulares ao peróxido de hidrogénio.

Os níveis intracelulares de radical superóxido e de peróxidos foram avaliados por citometria de fluxo. Para a determinação da extensão da presença de radical superóxido recorreu-se à sonda DHE (do inglês *dihydroethidium*), a qual atravessa facilmente a membrana celular e é oxidada pelo radical superóxido formando um composto vermelho fluorescente que se intercala no DNA. A relativa especificidade desta reação permite estimar a presença de radical superóxido a nível intracelular (Zhao *et al*, 2003; Halliwell & Whiteman, 2004; Dikalov *et al*, 2007). Por outro lado, a presença de peróxidos foi avaliada com recurso à sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Esta sonda lipofílica atravessa a membrana celular e, uma vez no meio intracelular, os seus dois grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares originando DCFH (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*), um composto não-fluorescente que é rapidamente oxidado por vários agentes oxidantes, incluindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dando origem ao composto fluorescente DCF (do inglês *2',7'-dichlorofluorescein*) (Dikalov *et al*, 2007; Rhee *et al*, 2010). Apesar da sonda utilizada ser um bom indicador da presença de peróxidos, é necessário ter em conta que a oxidação de DCFH com formação de DCF pode ser catalisada, em menor extensão, por outras ROS ou por peroxidases (Dikalov *et al*, 2007; Olney *et al*, 2013).

Para estimar a presença intracelular de peróxidos e do radical superóxido, as células foram semeadas e tratadas com concentrações crescentes de ácido ascórbico,

durante 24 horas, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8). Foram usadas um milhão de células por ensaio e por condição, inicialmente ressuspensas em 1 mL de PBS e colocadas em tubos devidamente identificados. Seguidamente, as células foram incubadas com 5  $\mu$ L de DHE na concentração de 1 mM (Sigma, D7008) durante 15 minutos ou 1  $\mu$ L de DCFH<sub>2</sub>-DA na concentração de 5  $\mu$ M (Molecular Probes, D-399) durante 45 minutos, a 37°C e protegido da luz. Após a incubação, a suspensão celular foi lavada com PBS por centrifugação a 1300 xG, durante 5 minutos e o sedimento ressuspenso em 400  $\mu$ L do mesmo. A detecção foi feita no citómetro de fluxo FACSCalibur com o comprimento de onda de excitação de 488 nm para o DCF e de 620 nm para o DHE. Os resultados obtidos dos histogramas de intensidade de fluorescência (Figura 21) foram expressos como a razão condição/controlo dos respetivos MIFs.

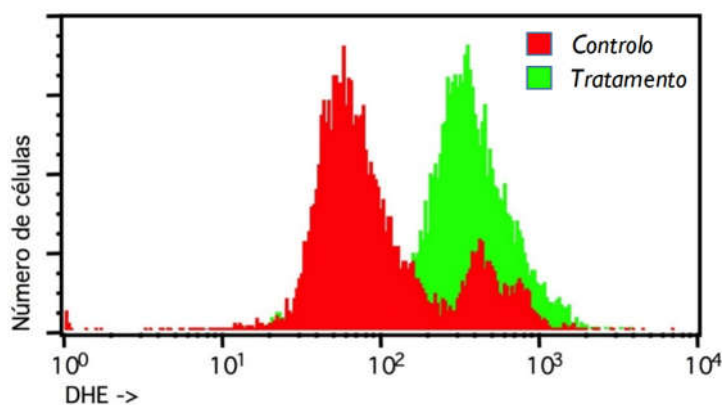


Figura 21: Histogramas de intensidade de fluorescência exemplificativos obtidos por citometria de fluxo, após a marcação com a sonda DHE de células controlo e de células tratadas.

As ROS são consideradas as maiores responsáveis pela alteração de macromoléculas, processo frequentemente denominado por stresse oxidativo. Contudo, para prevenir as lesões induzidas pelas ROS, as células possuem defesas antioxidantes responsáveis pela dismutação dos agentes oxidantes. Um dos mecanismos de defesa antioxidante inclui antioxidantes não-enzimáticos como a GSH. A GSH possui um papel multifacetado, na medida em que atua como neutralizador de ROS, reagindo com o oxigénio singlete, o radical hidroxilo e o radical superóxido, entre outras (Manda *et al*, 2009; Barrera, 2012). A expressão intracelular de GSH foi também avaliada por



citometria de fluxo, utilizando o alaranjado de mercúrio. Este composto fluorescente liga-se estequiometricamente aos grupos sulfidril, com maior especificidade para a GSH do que para os grupos sulfidril das proteínas. Esta ligação origina um produto de reação que emite fluorescência vermelha com um comprimento de onda de excitação de 488 nm.

O procedimento utilizado para a determinação da presença da GSH foi semelhante ao supracitado para os peróxidos e para o radical superóxido. Neste caso, as células foram incubadas com 4 µL de alaranjado de mercúrio na concentração de 10 mM (Sigma, M7750) durante 15 minutos, a 37°C e protegido da luz, e a deteção feita com o comprimento de onda de excitação de 620 nm.

A superóxido dismutase é outra defesa do sistema antioxidante que permite neutralizar ROS, de forma a manter o equilíbrio redox celular. Esta é responsável pela conversão do radical superóxido em oxigénio molecular e em peróxido de hidrogénio e pode apresentar-se em diversas formas na célula humana, incluindo Cu/Zn-SOD citosólica, SOD mitocondrial e SOD extracelular (McEligot *et al*, 2005; Manda *et al*, 2009; Barrera, 2012). Para a avaliação da atividade desta enzima, as células tumorais foram semeadas e tratadas com concentrações crescentes de ácido ascórbico, durante 24 horas, de acordo com o descrito na tabela I (condições 5 a 8). Seguidamente, foram obtidos extratos proteicos, de acordo com o procedimento descrito anteriormente, com a diferença que neste caso não se utilizou DTT com a solução de lise aquando da raspagem das células. Para a determinação da atividade da enzima SOD foi utilizado o *kit SOD Assay* (Sigma, 19160) e seguidas as instruções do fornecedor. A concentração de proteína nos extratos foi medida através do método do BCA. Os resultados foram expressos como razão condição/controlo, normalizados à quantidade de proteína.

Com o intuito de analisar as ROS que estariam implicadas na ação citotóxica do ácido ascórbico, estudou-se também o efeito de inibidores de stresse oxidativo em combinação com o AA, a nível da proliferação celular. A catalase é uma enzima antioxidante responsável pela rápida conversão do peróxido de hidrogénio em água e em oxigénio (Cai *et al*, 2007; Manda *et al*, 2009; Olney *et al*, 2013). Por sua vez, o manitol possui a capacidade de neutralizar o radical hidroxilo (Ding *et al*, 2004; Verrax *et al*,

2005, 2008), uma ROS extremamente reativa que atinge a maioria dos componentes celulares (hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos e proteínas) e cuja neutralização a nível celular não pode ser feita por reações enzimáticas mas que requer sistemas de reparação específicos e eficazes (Manda *et al*, 2009; Lipinski, 2011).

Neste estudo, de forma a permitir aferir a influência que o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo têm no mecanismo de citotoxicidade induzido pelo ácido ascórbico nas três linhas celulares tumorais em estudo, a catalase e o manitol foram utilizados como inibidor do peróxido de hidrogénio (pela sua destoxificação) e do radical hidroxilo, respetivamente, em combinação com o AA. Para tal, as células foram semeadas numa concentração de 50 000 células/mL para as C2BBel e WiDr ou de 70 000 células/mL para as LS1034 e tratadas primeiramente com concentrações crescentes de AA (de 0,25 mM a 20 mM). De seguida, e tendo por base o descrito na literatura, as células foram tratadas com uma concentração fixa de catalase (600 U/mL; Sigma, C1345) ou manitol (40 mM; Sigma, M9647), durante 24 horas (Ding *et al*, 2004; Ma *et al*, 2014). Nestes ensaios experimentais foram usados dois controlos, o controlo negativo constituído por culturas celulares em que não houve administração de qualquer composto (C) e controlo positivo constituído por culturas celulares tratadas apenas com catalase ( $C_{cat}$ ) ou com manitol ( $C_{man}$ ). Após o referido tempo de incubação, a proliferação celular foi avaliada usando o método do SRB anteriormente descrito. A proliferação celular foi expressa como a percentagem de proliferação das culturas submetidas ao tratamento combinado (AA + Catalase ou AA + Manitol) em relação às culturas controlo ( $C_{cat}$  ou  $C_{man}$ ). Os dados percentuais obtidos permitiram estabelecer curvas de dose-resposta e determinar os valores de  $IC_{50}$ , com recurso ao *software* OriginPro 8.0.

Para complementar as análises anteriormente descritas e tendo em conta que o mecanismo de ação do ácido ascórbico proposto na literatura reside na produção de  $H_2O_2$  a nível extracelular e sua posterior ação citotóxica a nível intracelular (Du *et al*, 2012; Wilson *et al*, 2014), foi importante entender qual a sensibilidade das diferentes linhas celulares tumorais ao  $H_2O_2$ . Para tal, as células foram semeadas numa concentração de 50 000 células/mL para as C2BBel e WiDr ou de 70 000 células/mL para as LS1034 e tratadas com concentrações crescentes de  $H_2O_2$  (Panreac, I21076)

(de 10  $\mu\text{M}$  a 750  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. A proliferação celular foi, posteriormente, avaliada também pelo método do SRB anteriormente descrito, e expressa como a percentagem de proliferação das culturas submetidas ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  em relação às culturas controlo negativo, às quais não foi administrado qualquer composto. Traçaram-se as curvas dose-resposta e obtiveram-se os respetivos valores de  $\text{IC}_{50}$  para cada linha celular.

#### *Análise da expressão de P53 por western blot*

Com o intuito de aprofundar o estudo do mecanismo de citotoxicidade do ácido ascórbico foi avaliada a expressão da proteína P53, de peso molecular 53 kDa, por *western blot*. Para tal, as células foram semeadas e tratadas com concentrações crescentes de AA, durante 24 horas, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 9 a 12). Seguidamente, extratos proteicos foram devidamente preparados e quantificados e a técnica de *western blot* realizada como descrito anteriormente, com a variação de algumas condições experimentais enunciadas em seguida. Os géis de acrilamida foram sujeitos a uma eletroforese durante 20 minutos sob a diferença de potencial de 80 V e seguida de 1 hora e 25 minutos a 160 V. A eletrotransferência foi posteriormente realizada em meio húmido usando uma diferença de potencial de 100 V durante 1 hora. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-P53 (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-47698) e, de seguida, com o anticorpo secundário apropriado *goat-anti-mouse*. Por fim, as membranas foram reveladas com o leitor de fluorescência e com recurso ao *software* ImageQuant 5.0. as bandas das proteínas de interesse foram quantificadas.

#### *Análise da expressão de VEGF-R1 por citometria de fluxo*

Para avaliar a expressão membranar de VEGF-R1, as células foram semeadas e tratadas com concentrações crescentes de ácido ascórbico, durante 24 horas, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8).

No caso do recetor VEGF-R1, um milhão de células por ensaio foram destacadas dos frascos e centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, e os *pellets* obtidos ressuspensos em 2 mL de PBS. Após nova centrifugação, igualmente a 1300 xG durante 5 minutos, o sobrenadante foi decantado e adicionados 100 µL de BSA a 0,5% (em PBS) e 3 µL de anticorpo monoclonal anti-VEGF-APCy (APCy, do inglês *allophycocyanin*; R&D Systems, FAB321A). Incubaram-se as células durante 20 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, lavaram-se com 2 mL de PBS seguida de centrifugação a 1300 xG durante 5 minutos e ao *pellet* resultante adicionaram-se 400 µL de PBS. A deteção foi feita no citómetro de fluxo FACSCalibur com o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados obtidos foram expressos como a razão condição/controlo dos respetivos MIFs.

#### *Análise da expressão de PGP por citometria de fluxo*

Para avaliar a expressão membranar de PGP, as células foram igualmente semeadas e tratadas com concentrações crescentes de ácido ascórbico, durante 24 horas, de acordo com o descrito na Tabela 3 (condições 5 a 8).

A determinação da sua expressão membranar foi feita com recurso à citometria de fluxo, usando um milhão de células por ensaio. As células foram destacadas dos frascos e as suspensões celulares foram seguidamente centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, e os *pellets* obtidos ressuspensos em 2 mL de PBS. Após nova centrifugação a 1300 xG durante 5 minutos, o sobrenadante foi decantado e adicionados 3 µL de anticorpo monoclonal anti-hPGP-FITC (BD Pharmingen™, 557002) ficando as células a incubar durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, lavaram-se as células com 2 mL de PBS seguida de nova centrifugação a 1300 xG durante 5 minutos. Ao *pellet* resultante adicionaram-se 400 µL de PBS e guardaram-se a 4°C até leitura no citómetro. A deteção foi feita com recurso a um citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) após excitação com luz de 488 nm de comprimento de onda. Para análise e quantificação da informação utilizou-se um *software* específico que corre em computador dedicado (Machintosh Software, Paint-a-Gate 3.02), sendo os

resultados obtidos em MIF, com normalização ao controlo.

## Estudos de farmacocinética

O mecanismo de transporte do ácido ascórbico para o interior da célula é mediado por transportadores dependentes de sódio, SVCT-1 e SVCT-2. No entanto, a vitamina C também pode ser captada na sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA), pelos transportadores de glicose, nomeadamente o GLUT-1 e o GLUT-3, o qual é rapidamente reduzido no meio intracelular com formação de AA (Wilson *et al*, 2014). A expressão daqueles transportadores, assim como, a cinética de entrada do AA na célula tumoral, foram parâmetros avaliados com o intuito de compreender a sua influência no mecanismo de ação do AA nas três linhas celulares em estudo.

### **Expressão dos transportadores de vitamina C**

Assim, sabendo que a expressão dos diferentes transportadores de vitamina C nas linhas celulares em estudo estará implicada no seu efeito anti-cancerígeno, procedeu-se à sua quantificação basal e após tratamento com ácido ascórbico.

A avaliação da expressão membranar de GLUT-1 de GLUT-3, de SVCT-1 e de SVCT-2 nas três linhas celulares foi realizada com recurso à citometria de fluxo, usando um milhão de células por ensaio. As células foram previamente tratadas com concentrações crescentes de AA, durante 24 horas, de acordo com a Tabela 3 (condições 5 a 8). Para tal, realizou-se o procedimento descrito anteriormente para a avaliação da expressão de PGP, com recurso aos anticorpos monoclonais anti-hGLUT1-PE (PE, do inglês *phycoerythrin*; R&D Systems, FABI418P), anti-hGLUT3 (R&D Systems, MABI415), anti-SVCT1 (Santa Cruz Technology, sc-376090) e anti-SVCT2 (Santa Cruz Technology, sc-30114). As marcações com anti-hGLUT3 e com anti-SVCT1 foram ainda complementadas com a marcação secundária, com o anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG-PE* (Santa Cruz Biotechnology, sc-3738) durante

20 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Procedeu-se da mesma forma para a marcação com anti-SVCT2, contudo, neste caso com recurso ao anticorpo secundário *mouse anti-rabbit IgG-PE* (Santa Cruz Biotechnology, sc-3753).

A expressão de SVCT-1 e de SVCT-2 foi também quantificada com recurso à técnica de *western blot*. As células foram previamente tratadas com concentrações crescentes de ácido ascórbico, durante 24 horas, de acordo com a Tabela 3 (condições 9 a 12). Seguidamente, para quantificar a expressão de SVCT-1 e de SVCT-2, extratos proteicos foram devidamente preparados e quantificados. A técnica de *western blot* foi realizada como descrito anteriormente, com a variação de algumas condições experimentais enunciadas em seguida. Os géis de acrilamida foram sujeitos a uma eletroforese com diferentes condições, de acordo com o transportador em estudo. Assim, para o SVCT-1 a eletroforese iniciou-se com a diferença de potencial 100 V durante 10 minutos seguida de 1 hora e 15 minutos a 150 V, enquanto para o SVCT-2 a eletroforese se iniciou com uma diferença de potencial de 100 V durante 10 minutos seguida durante 1 hora e 30 minutos a 150 V. No caso da linha celular C2BBel, a eletrotransferência foi realizada em meio semi-húmido com recurso ao equipamento Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). Para tal, utilizou-se uma intensidade de corrente constante de 1,3 A durante 10 minutos para deteção do SVCT-1, e durante 7 minutos para deteção do SVCT-2. No caso das linhas celulares LS1034 e WiDr, a eletrotransferência foi realizada em meio húmido, utilizando uma diferença de potencial de 100 V durante 1 hora. Em todos os casos, as membranas foram incubadas, após bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente em solução de BSA a 4%, com o anticorpo primário anti-SVCT1 (Santa Cruz Technology, sc-376090) diluído na proporção de 1:100 ou com o anticorpo primário anti-SVCT2 (Santa Cruz Technology, sc-30114), diluído na proporção de 1:120. Seguidamente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado, *goat anti-mouse* (GE Healthcare, RPN5781) para o SVCT-1 ou *goat anti-rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, sc-2007) para o SVCT-2, diluídos na proporção de 1:10 000. Por fim, com recurso ao *software ImageQuant 5.0*, as membranas foram reveladas usando o leitor de fluorescência e as bandas das proteínas de interesse quantificadas, nomeadamente entre 20 e 40 kDa para o SVCT-1 e aproximadamente 50 kDa para o SVCT-2.

### **Estudos de influxo com $^{99m}\text{Tc-AA}$**

Adicionalmente, para averiguar a presença intracelular do ácido ascórbico, utilizou-se metodologia de medicina nuclear pelo que se procedeu à marcação radioativa do ácido ascórbico com  $^{99m}\text{Tc}$  de forma a constituir o complexo  $^{99m}\text{Tc-AA}$ , por procedimentos por nós previamente otimizados e publicados (Pires, 2008; Mamede, 2010; Mamede *et al*, 2012a). Assim, a metodologia de radiomarcação compreendeu duas fases. A primeira fase consistiu na adição do agente redutor ( $\text{FeCl}_3$ ) ao pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ ), com o objetivo de diminuir o estado de oxidação deste último. A segunda fase consistiu na reação de complexação com o AA (ligando). Desta forma, a 222 MBq de  $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$  num volume de 1,5 mL, adicionaram-se 0,2 mL do agente redutor, constituído por uma solução de  $\text{FeCl}_3$  a na concentração de 0,1 M (Sigma, 157740) em HCl a 0,1 N (Sigma, 258148). Posteriormente, a solução obtida foi adicionada a um frasco com 200 mg de AA previamente argonado e protegido da luz. Após leve agitação, o pH foi elevado até 6,5 pela adição de 1,2 mL de uma solução de NaOH (Sigma, S5881) com a concentração de 1 M, o que foi confirmado pelo método de comparação de cores (pH-Fix 4.5-10.0, Machenerey-Nagel).

Seguiu-se a determinação da pureza radioquímica do complexo marcado. A pureza radioquímica entende-se como a fração de radioatividade na forma química desejada em relação à radioatividade total. As impurezas radioquímicas são, por isso, decorrentes da possível ineficiência do processo de marcação e, neste caso, podem apresentar-se na forma de pertecnetato livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) ou de tecnécio reduzido-hidrolisado não ligado ( $^{99m}\text{Tc-RH}$ ) (Vallabhajosula *et al*, 2010). Para este efeito, a separação do complexo marcado e dos contaminantes foi feita por cromatografia líquida de alta precisão, comumente designada por HPLC (do inglês, *high performance liquid chromatography*). Neste método de separação uma amostra é aplicada numa coluna de cromatografia de comprimento e enchimento adequados, que constitui a fase estacionária, e arrastada por uma fase líquida móvel (solvente) que passa através da coluna e na qual os componentes da amostra são eluídos (Heftmann, 2004). As interações das forças intermoleculares líquido-sólido permitem que os componentes da amostra, dissolvidos na fase móvel, se desloquem com esta ou aderiram ao material de

enchimento da coluna. Desta forma, os componentes com maior afinidade para a fase móvel serão primeiramente detetados (Mcmaster, 2007).

Para o propósito deste trabalho utilizou-se o HPLC de fase-reversa com dois detetores em linha, um detetor de ultravioleta (UV) que mede a absorvância de luz da amostra, e um detetor de radiação que mede a concentração dos componentes radioativos. Os detetores deverão ser capazes de reconhecer quando o analito é eluído da coluna, monitorizando as alterações na composição da fase móvel, e converter esse dado num sinal elétrico de modo que este seja, posteriormente, visualizado em cromatogramas como um desvio da linha de base (Meyer, 2010). Os cromatogramas obtidos, mostram o valor real da detecção de cada componente, em milivoltes (mV) para a detecção por UV e em contagens por segundo (CPS) para a detecção da emissão radioativa, em função do seu tempo de retenção. Entende-se por tempo de retenção o tempo que o composto leva a percorrer a distância desde a coluna até ao detetor.

O método de HPLC usado permitiu a separação dos seguintes componentes: AA e FeCl<sub>3</sub> por detecção UV e <sup>99m</sup>Tc-AA e <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> por detetor de radiação. A análise foi feita com recurso a um equipamento *Gilson* composto por *UV/VIS-151 Detector*, *321-PUMP* e *506-C System Interface*, conectado a um computador dedicado e que corre o *software* *Gina-Star 2.14* (Agilent Technologies, Alemanha) para definição dos métodos de corrida e de processamento dos resultados por integração gráfica dos cromatogramas. O método de separação compreendeu o uso de uma coluna *Nucleosil* com pré-coluna (Hichrom, NC-100-5C18-250AF) como fase estacionária, e como fase móvel um gradiente de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,025 M e pH 3) e metanol (Sigma, 34860) na proporção de 96/4 (v/v). A corrida foi realizada com fluxo constante de 1 mL/min e a detecção UV efetuada no comprimento de onda de 205 nm. O método incluiu também uma passagem da fase líquida para a estabilização do equipamento, prévia à injeção da amostra, durante 60 minutos e outra passagem para se fazer a lavagem do sistema após obtenção dos cromatogramas desejados, durante 60 minutos e com uma fase móvel constituída por um gradiente de metanol/H<sub>2</sub>O iniciado na proporção de 90/10 e finalizado na proporção de 95/5 (v/v).



Esta avaliação da pureza radioquímica, que constitui o controlo de qualidade da marcação do complexo  $^{99m}\text{Tc-AA}$ , foi efetuada aos 0, aos 30, aos 60, aos 120 e aos 180 minutos, após a preparação. Para tal, uma amostra de 25  $\mu\text{L}$  foi transferida para a micro-seringa (*Hamilton*) e injetada no *loop*, iniciando-se o método anteriormente descrito. Como controlos analisaram-se amostras de  $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ , de AA e de  $\text{FeCl}_3$ , para tornar possível a interpretação dos cromatogramas obtidos para o complexo radiomarcado. A quantificação dos analitos presentes na amostra foi feita por integração gráfica das regiões de interesse (ROIs, do inglês *regions of interest*). A pureza radioquímica do complexo preparado ( $^{99m}\text{Tc-AA}$ ) foi dada pelas quantidades percentuais das áreas de interesse em função da radioatividade total detetada, e traduz-se na equação 3.

$$(\% \text{ } ^{99m}\text{Tc AA}) = 100 \left( \frac{\text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^-}{\text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{ } ^{99m}\text{Tc AA}} \right) \quad (3)$$

Após a obtenção de uma formulação com elevada pureza radioquímica foram efetuados estudos de influxo do complexo  $^{99m}\text{Tc-AA}$  e de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  pelas três linhas celulares tumorais em estudo. Assim, para cada estudo foram necessárias suspensões celulares com  $2 \times 10^6$  células/mL em frascos de 25  $\text{cm}^2$ . Depois das células repousarem durante uma hora, adicionaram-se à suspensão celular 0,925 MBq/mL do complexo  $^{99m}\text{Tc-AA}$  ou de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , iniciando-se a contagem do tempo. Aos 5, aos 30, aos 60, aos 90 e aos 120 minutos, foram retiradas amostras de 200  $\mu\text{L}$ , em duplicado, que foram inseridas em microtubos *ependorf*<sup>®</sup> devidamente identificados e contendo PBS gelado. Estas foram posteriormente centrifugadas a 5600 xG, durante 1 minuto, numa centrífuga *Costar*<sup>™</sup> (modelo 10 Mini Centrifuge, EUA), para separação do sobrenadante para um tubo de RIA devidamente identificado. Adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de PBS a cada microtubo, seguindo-se nova centrifugação a 5600 xG, durante 1 minuto, após a qual se recolheu novamente o sobrenadante para o respetivo tubo de RIA. A radioatividade de ambas as frações foi medida separadamente num contador de poço (DPC Gamma C12) e a captação percentual de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  e de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  determinada de acordo com a equação 4.

$$\text{Captação}(\%) = \frac{\text{CPM}_{\text{pellet}}}{\text{CPM}_{\text{pellet}} + \text{CPM}_{\text{sobrenadante}}} \times 100 \quad (4)$$

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® 22.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas e da homogeneidade de variâncias foi feita de acordo com os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respetivamente. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias e testes não paramétricos em caso contrário.

Na análise de proliferação celular segundo o método SRB, os valores experimentais obtidos foram ajustados, utilizando o *software* OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA) versão 8.0, a um modelo sigmoidal de dose-resposta representado na equação 5,

$$\text{Proliferação (\%)} = A1 + \frac{A2-A1}{1+10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (5)$$

onde  $A1$  e  $A2$  correspondem às assíntotas da curva e  $x_0$  ao valor que inibe a proliferação celular em 50% ( $IC_{50}$ ). A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas, dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica, foi realizada segundo o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator, com comparações múltiplas de acordo com a correção de *Bonferroni*.

As comparações entre as várias condições terapêuticas (para cada linha celular) foram realizadas segundo o teste ANOVA de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste *Kruskal-Wallis* (caso contrário). As comparações múltiplas em caso de variâncias não presumidas foram realizadas segundo o teste de *Games-Howell* ou com a correção de *Bonferroni* em caso contrário.

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

## RESULTADOS

### Citotoxicidade do ácido ascórbico

Os estudos de citotoxicidade permitiram averiguar o efeito de elevadas concentrações de ácido ascórbico nas três linhas celulares de cancro colorretal em estudo, a nível da proliferação, da sobrevivência e da viabilidade celulares, das alterações no ciclo celular, das vias de morte celular envolvidas e da genotoxicidade.

#### *Proliferação celular*

A proliferação celular após tratamento com ácido ascórbico, avaliada pelo ensaio SRB como medida do conteúdo proteico total, foi determinada relativamente a culturas celulares denominadas de controlo, ou seja, não sujeitas a tratamento, e às quais se atribuiu um valor de proliferação de 100%. A análise dos resultados experimentais permitiu o estabelecimento das curvas sigmoidais de melhor ajuste para cada linha celular e para cada condição, representadas na Figura 22. A partir das curvas dose-resposta obtidas foi possível determinar as concentrações inibitórias médias ( $IC_{50}$ ), ou seja, as concentrações necessárias para inibir a proliferação celular em 50%, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.

De acordo com a Figura 22, verifica-se que o ácido ascórbico induziu a inibição da proliferação celular de forma dependente da concentração e da linha celular, mas não do tempo de incubação. Pela análise da Figura 22 e da Tabela 4, verifica-se que as células da linha celular C2BBel são as mais sensíveis ao AA, apresentando valores de  $IC_{50}$  significativamente mais baixos que os obtidos para as células das linhas celulares LS1034 ( $p < 0,001$ ) e WiDr ( $p < 0,05$ ), para todos os tempos de incubação. Contrariamente, as células da linha celular LS1034 mostraram ser as mais resistentes ao AA, com valores de  $IC_{50}$  significativamente mais elevados que os obtidos nas células C2BBel ( $p < 0,001$ ) para

todos os tempos de incubação e nas células WiDr ( $p < 0,001$ ) às 24 e às 48 horas. De referir que após 24 horas de tratamento com ácido ascórbico, os valores de  $IC_{50}$  foram de 0,95 mM para as células da linha celular C2BBel, de 4,85 mM para as células da linha celular LS1034 e de 2,29 mM para as células da linha celular WiDr.

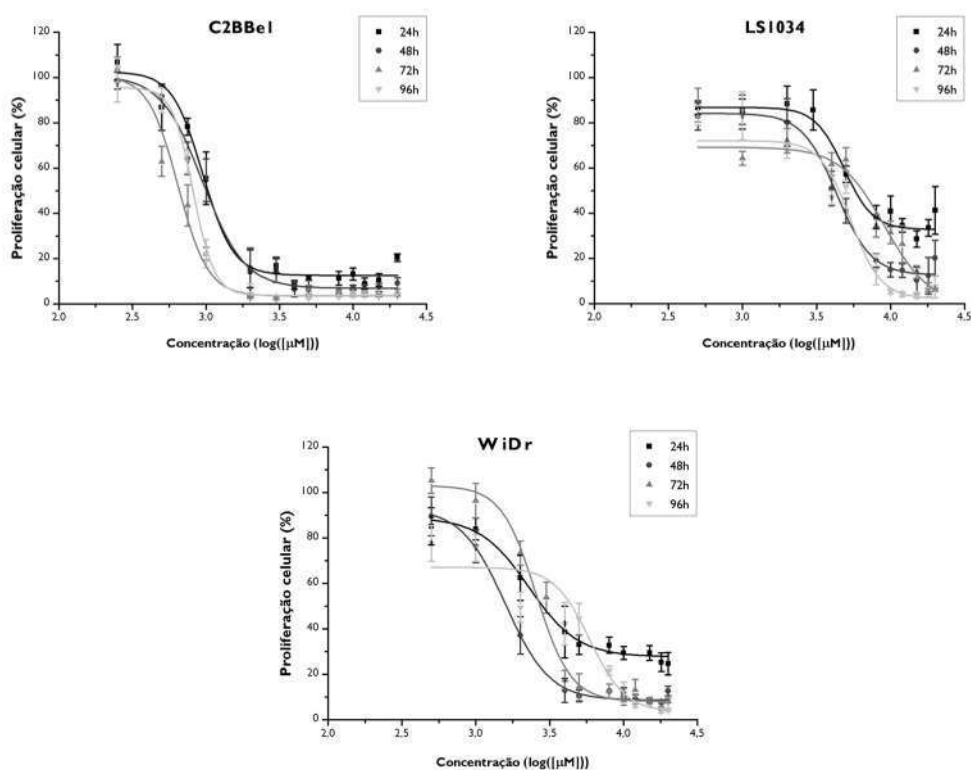


Figura 22: Curvas de dose-resposta das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr em resposta à incubação com AA durante 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados representam a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da concentração de AA e expressam a média e o desvio-padrão de pelo menos quatro experiências independentes, em triplicado.

Analisando cada linha celular individualmente, não se verificam diferenças estatisticamente significativas nos valores de  $IC_{50}$  obtidos para as células da linha celular C2BBel nos diferentes tempos de incubação. Por outro lado, quando as células LS1034 foram expostas ao AA durante 96 horas, a concentração inibitória média foi 5,37 mM, significativamente superior ( $p < 0,001$ ) à obtida às 24 horas que foi de 4,85 mM, e significativamente inferior ( $p = 0,015$ ) à obtida às 72 horas que foi de 9,11 mM. As células da linha celular WiDr, após 96 horas de incubação com AA o  $IC_{50}$  obtido foi de 5,90 mM, estatisticamente superior ( $p < 0,001$ ) ao das 48 horas de incubação (1,59 mM) e ao obtido

após 72 horas de tratamento que foi de 2,55 mM ( $p < 0,001$ ).

Tabela 4: Valores de  $IC_{50}$  obtidos após incubação das linhas celulares C2BBe1, LSI034 e WiDr com AA durante 24, 48, 72 e 96 horas. Estão também representados os valores de  $r^2$  e intervalos de confiança (95%) obtidos.

<b>Linha celular</b>	<b>Tempo de Incubação (h)</b>	<b><math>IC_{50}</math> (mM)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Intervalo de Confiança (mM)</b>
C2BBe1	24	0,95	0,91	[0,64 ; 1,40]
	48	0,95	0,99	[0,82 ; 1,00]
	72	0,65	0,92	[0,48 ; 0,72]
	96	0,82	0,96	[0,71 ; 0,86]
LSI034	24	4,85	0,98	[4,31 ; 5,45]
	48	4,33	0,99	[3,94 ; 4,49]
	72	9,11	0,98	[6,90 ; 10,16]
	96	5,37	0,96	[4,32 ; 5,84]
WiDr	24	2,29	0,98	[1,57 ; 3,32]
	48	1,59	0,94	[0,99 ; 1,91]
	72	2,55	0,98	[2,19 ; 2,70]
	96	5,90	0,93	[4,46 ; 6,59]

### **Sobrevivência celular**

Comprovado o efeito anti-proliferativo do ácido ascórbico sobre as três linhas celulares em estudo, avaliou-se de seguida o seu efeito a longo prazo com recurso ao ensaio clonogénico. Este ensaio permite avaliar a sobrevivência celular, isto é, a capacidade de células individuais formarem colónias após exposição a um determinado tratamento e incubação durante o tempo equivalente a, pelo menos, seis vezes o seu tempo de duplicação (Franken *et al*, 2006).

A Figura 23 evidencia os resultados obtidos em termos de fator de sobrevivência, a partir dos quais se verifica que o AA induz uma diminuição acentuada da sobrevivência celular, de modo dependente da concentração, em todas as linhas celulares em estudo.

Quando as células foram tratadas com 5 mM de AA, o fator de sobrevivência diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) em comparação com o controlo, diminuindo para  $11,66 \pm 1,61\%$  nas células da linha celular C2BBel, para  $1,65 \pm 0,46\%$  nas células da linha celular LSI034 e para  $3,47 \pm 0,39\%$  nas células da linha celular WiDr.

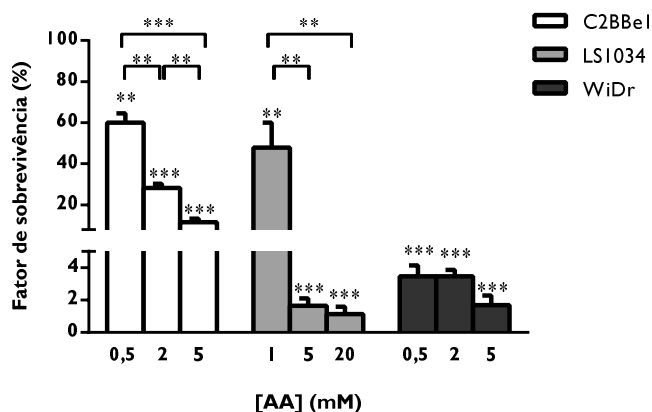


Figura 23: Sobrevivência celular das células das linhas C2BBel, LSI034 e WiDr após exposição ao AA durante 12 dias. Os resultados expressam a média percentual e o erro padrão de colónias formadas em relação ao controlo e ao número de células semeadas de, pelo menos, 2 experiências independentes realizadas em triplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

## Ciclo celular

A análise do conteúdo de DNA das populações celulares permite distribuí-las pelas diferentes fases do ciclo celular em que se encontram. Assim, os efeitos induzidos pelo tratamento com ácido ascórbico a nível do ciclo celular das diferentes linhas celulares em estudo estão evidenciados na Figura 24.

Na linha celular C2BBel, a presença de 10 mM de AA induziu um bloqueio na fase S do ciclo celular que se traduziu, comparando com a situação controlo, por um aumento de 18,8% de células na fase S, acompanhado pela diminuição significativa ( $p = 0,036$ ) de 8,7% de células na fase G2/M. Paralelamente, pudemos ainda verificar que quanto maior a concentração de AA, maior o pico apoptótico (pico pré-G0/G1), na medida em que com 10 mM de AA se registou um aumento de 12,2% de células nesta fase, com diferenças estatisticamente significativas comparando com todas as restantes

condições com valores de  $p=0,001$  em relação ao controlo,  $p=0,0005$  em relação ao tratamento com 0,5 mM e  $p=0,0011$  em relação ao tratamento com 1 mM.

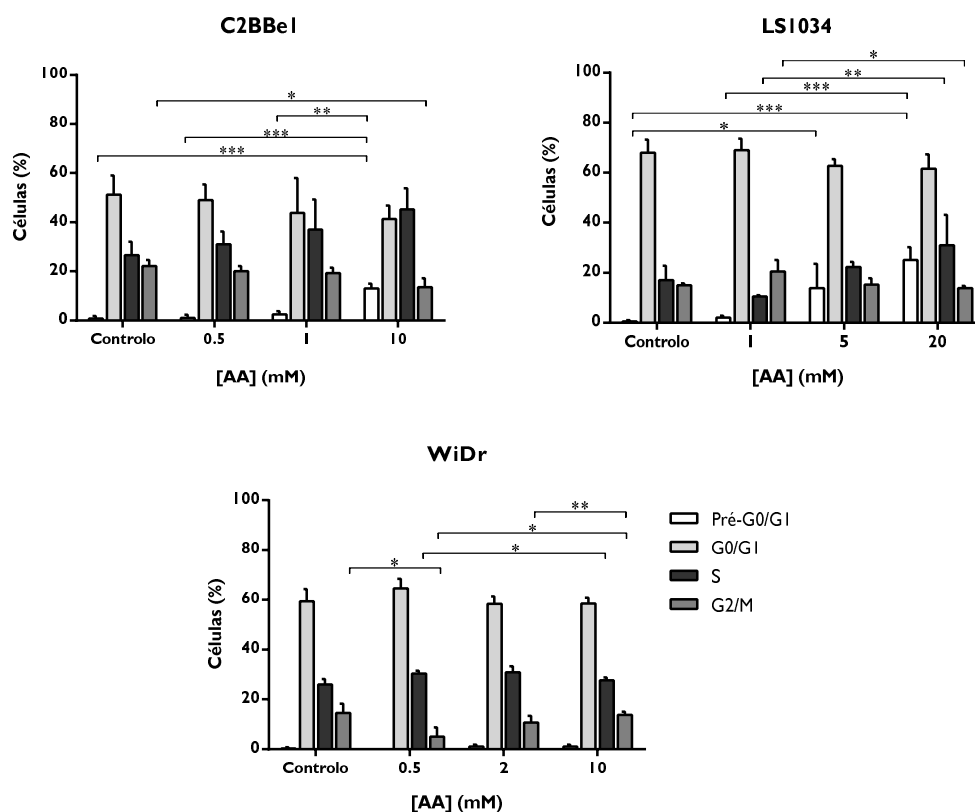


Figura 24: Análise do ciclo celular das células das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células no pico apoptótico (Pico Pré-G0/G1) e nas fases G0/G1, S e G2/M. Os resultados exprimem a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes, realizadas na sua maioria em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

O padrão de distribuição das populações de células LS1034 pelas várias fases do ciclo celular após exposição ao AA é semelhante ao das células C2BBe1. Destaca-se assim o bloqueio do ciclo celular na fase S após exposição a 20 mM de ácido ascórbico. Nesta condição, se compararmos com o tratamento com a concentração de 1 mM de AA, verificou-se o aumento significativo ( $p=0,007$ ) em 14% de células na fase S que foi acompanhado pela diminuição significativa ( $p=0,026$ ) do número de células na fase G2/M. É igualmente evidente o aumento do pico apoptótico, de forma dependente da concentração de AA. Assim, e comparando com a condição controlo, o tratamento com

5 mM de ácido ascórbico induziu um aumento significativo ( $p=0,035$ ), com 13,75% de células nesta fase do ciclo celular, enquanto o tratamento com 20 mM induziu um aumento significativo ( $p=0,0003$ ), com 25% de células.

Na linha celular WiDr não se verificam alterações dependentes do aumento da concentração de ácido ascórbico, na medida em que as diferenças significativas em relação ao controlo não se refletem nas restantes condições e vice-versa.

### ***Viabilidade e mecanismos de morte celular***

Para averiguar até que ponto a diminuição da proliferação e da sobrevivência celulares, após tratamento com ácido ascórbico, foi acompanhada por um aumento da morte celular, a viabilidade celular e os tipos de morte celular induzida foram analisados por citometria de fluxo, com recurso à dupla marcação com AV e com IP. Esta técnica foi ainda complementada com a avaliação morfológica, com recurso à coloração *May-Grünwald-Giemsa*. Com o intuito de estudar as vias de morte celular ativadas, avaliou-se também a expressão de BAX e de BCL-2 e as alterações do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por citometria de fluxo e a expressão de caspase-8 e -9 por *western blot*. O ensaio cometa foi utilizado para avaliar a genotoxicidade induzida pelo AA. Posteriormente, foi também estudada a sua influência no ambiente redox da célula tumoral, pela quantificação da produção intracelular de ROS e das defesas antioxidantes, assim como, pela avaliação do resultado da sua inibição. Ainda com o intuito de estudar os mecanismos de ação do ácido ascórbico, avaliou-se a expressão de algumas proteínas que poderiam estar associadas à resposta ou à resistência da célula tumoral ao AA, entre elas, a P53, o VEGF-R1 e a PGP. Os procedimentos supracitados foram realizados após 24 horas de exposição ao ácido ascórbico.

### *Viabilidade e morte celulares*

Na Figura 25 estão representadas as diferentes populações celulares identificadas



em cada uma das condições testadas. A viabilidade celular foi influenciada pela presença de ácido ascórbico de uma forma dependente da concentração, pois com o aumento da concentração de AA, a viabilidade celular diminui em todas as linhas celulares. A Figura 26 mostra imagens representativas das alterações morfológicas celulares induzidas pela presença de AA.

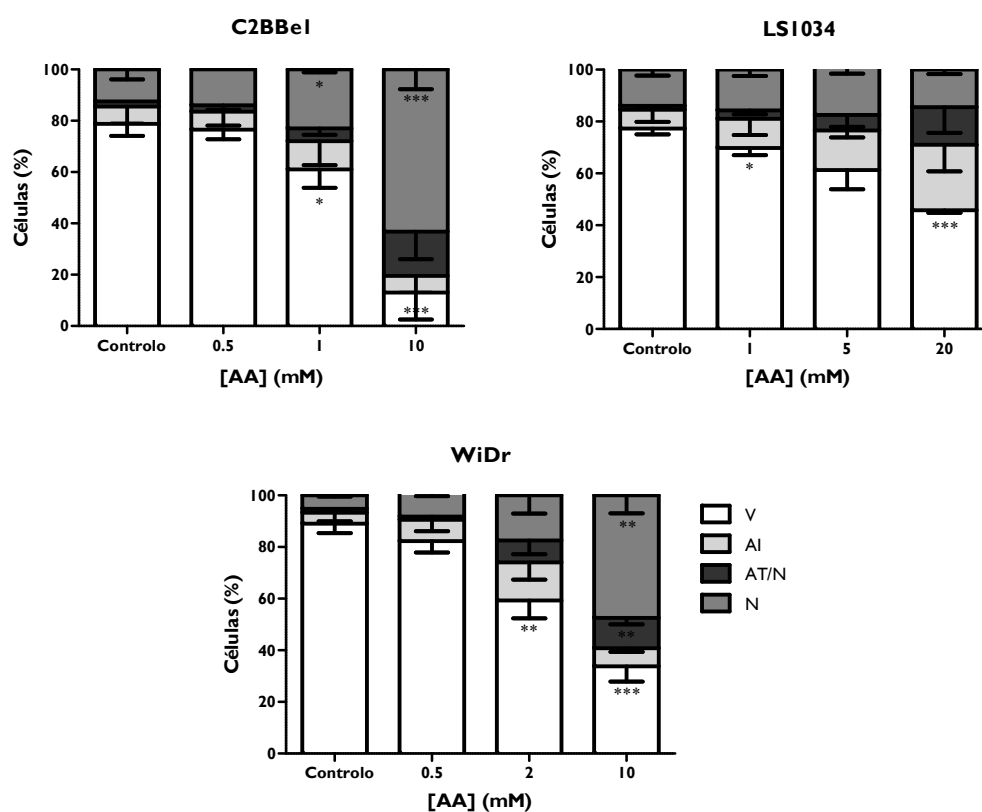


Figura 25: Viabilidade celular e tipos de morte celular induzidos nas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados estão representados na forma de percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e em necrose (N). Os resultados exprimem a média e o desvio-padrão de pelo menos duas experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas, relativamente ao controlo, estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

As células da linha celular C2BBel mostraram ser as mais sensíveis ao AA com um decréscimo significativo ( $p < 0,001$ ) da viabilidade celular, relativamente ao controlo, de  $78,8 \pm 4,7\%$  para  $13,0 \pm 10,4\%$  após tratamento com 10 mM de ácido ascórbico, enquanto as células LS1034 mostraram ser as mais resistentes, com a diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da viabilidade celular, igualmente em relação ao controlo, de

77,3±2,2% para 45,8±1,0% após exposição a 20 mM de AA. Por sua vez, e continuando a comparar com a situação controlo, a percentagem de células WiDr viáveis diminuiu significativamente de 89,0±3,7% para 59,3±6,9% após exposição a 2 mM de AA ( $p=0,003$ ) e para 33,8±5,9% após exposição a 10 mM de AA ( $p<0,001$ ).

A redução da população de células C2BBe1 viáveis após exposição a 10 mM de ácido ascórbico foi acompanhada pelo aumento significativo ( $p<0,001$ ) de 15,3% de células em apoptose tardia/necrose e de 50,8% de células em necrose. A análise morfológica (Figura 26) corrobora estes dados permitindo aferir que concentrações mais baixas de AA induzem morte celular por apoptose, sendo constatada a formação de *blebs* e de corpos apoptóticos, assim como, fragmentação nuclear. Por outro lado, com a maior concentração de AA testada (10 mM) as células C2BBe1 mostraram maioritariamente características de necrose, com lise celular e, conseqüente, extravasamento do citoplasma, associada à manutenção da integridade nuclear.

Nas células LSI034 foi observada a predominância de células em apoptose (25,3±10,2%) e apoptose tardia/necrose (14,5±9,9%) após tratamento com 20 mM de AA. A análise das imagens mostradas na Figura 26 mostrou uma predominância das características morfológicas de morte por apoptose para todas as condições de tratamento testadas, com visualização de *blebs*, fragmentação do núcleo e vacuolização.

Relativamente às células WiDr, 2 mM de AA induziram um aumento de 10,5% de células em apoptose comparativamente ao controlo. Contudo, com concentrações de AA mais elevadas (10 mM) verificou-se uma predominância de morte por necrose, com o aumento da percentagem de células em necrose na condição de 10 mM (47,5±7,0%), quando comparada com o controlo (5,3±0,5%;  $p=0,0035$ ), com a condição de 0,5 mM (8,5±0,6%;  $p=0,0044$ ) e com a condição de 2 mM (17,5±7,1%;  $p=0,0037$ ). A análise morfológica (Figura 26) para o tratamento com 10 mM de AA, mostrou algumas células em necrose com lise celular e com núcleo íntegro, mas na sua maioria células com características morfológicas de morte por apoptose, nomeadamente a formação de *blebs* e fragmentação nuclear.

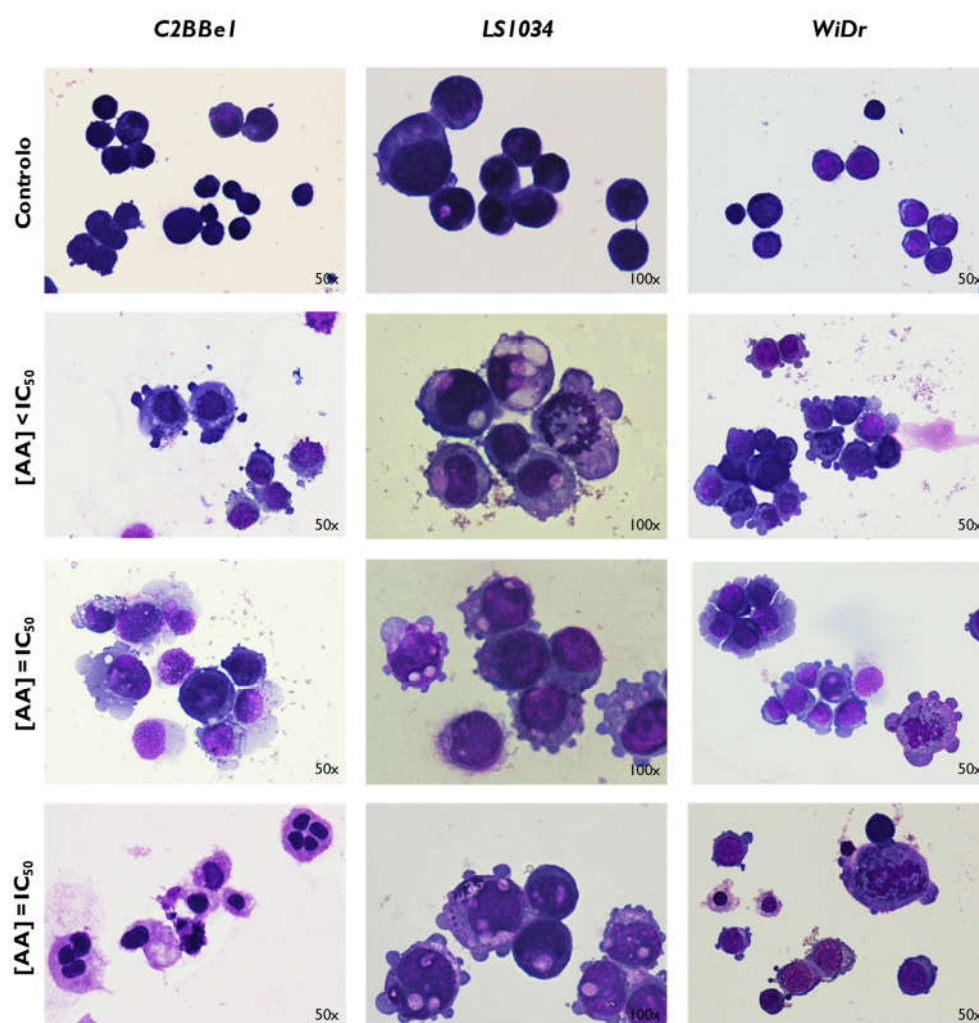


Figura 26: Análise morfológica das células C2BBe1, LS1034 e WiDr. As imagens representativas foram obtidas após coloração *May-Grünwald-Giemsa* e ilustram os resultados obtidos na ausência de AA (Controlo) e após exposição ao AA durante 24 horas, na concentração correspondente ao  $IC_{50}$  de cada linha celular ( $[AA]=IC_{50}$ ) e numa concentração superior a essa ( $[AA]>IC_{50}$ ). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 50x ou 100x.

### Expressão de BAX e BCL-2

A Figura 27 (A) apresenta os níveis de expressão proteica basais de BCL-2 e de BAX em todas as linhas celulares em estudo. As células LS1034 são as que têm menor expressão de BCL-2 ( $20,3\pm 3,6$  MIF), comparativamente às células C2BBe1 ( $50,5\pm 9,1$  MIF;  $p=0,044$ ) e às WiDr ( $46,0\pm 5,8$  MIF;  $p=0,007$ ). Pelo contrário, as células C2BBe1 são as que apresentam maior expressão de BAX ( $125,8\pm 26,1$  MIF), quando comparadas

com as da linha celular LS1034 ( $31,8 \pm 8,2$  MIF;  $p=0,032$ ) e com as da linha celular WiDr ( $63,0 \pm 9,7$  MIF). Analisando os níveis de expressão em cada linha celular individualmente é de realçar que, na linha celular C2BBel, a expressão de BAX é 2,5 vezes superior à expressão de BCL-2, diferença com significado estatístico ( $p=0,010$ ).

Através da análise da Figura 27 (B) verifica-se que a razão BAX/BCL-2 aumentou de forma dependente da concentração de ácido ascórbico em todas as linhas celulares. Quando as células C2BBel e as LS1034 foram expostas às maiores concentrações de AA testadas, a razão BAX/BCL-2 foi, respetivamente,  $1,7 \pm 0,2$  ( $p=0,010$ ) e  $2,8 \pm 0,4$  ( $p=0,006$ ) vezes superior à do controlo, aumentos com significado estatístico.

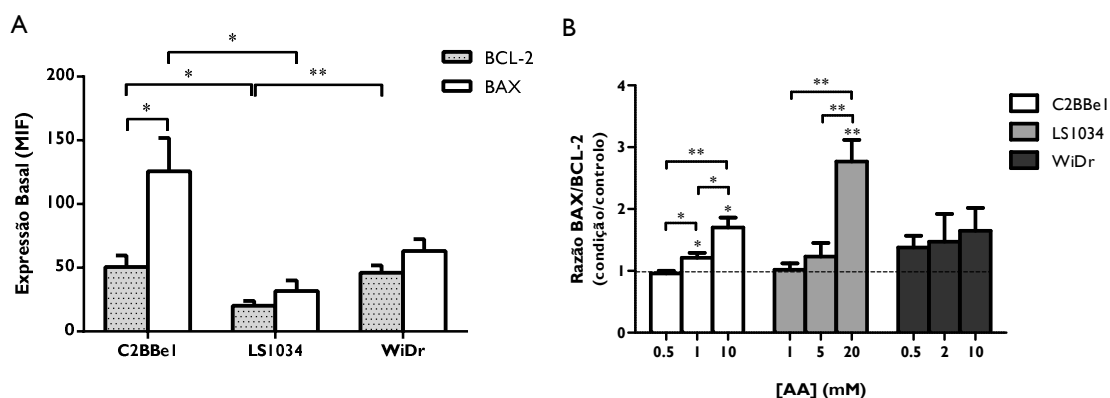


Figura 27: Expressão proteica de BAX e de BCL-2 das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr. (A) Expressão basal dos níveis de BAX e de BCL-2, apresentados em MIF. (B) Os níveis de expressão após exposição ao AA durante 24 horas são expressos em razão BAX/BCL-2 relativamente ao controlo. Os resultados exprimem a média e o desvio-padrão de pelo menos duas experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre linhas em (A) e relativamente ao controlo em (B) estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

### Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

Para avaliar o papel da mitocôndria na morte celular induzida pelo ácido ascórbico, avaliaram-se as alterações a nível do  $\Delta\psi_m$  das células das várias linhas celulares em estudo após exposição ao AA durante 24 horas (Figura 28). De salientar que quanto menor a razão A/M, menor o potencial de membrana mitocondrial, o que indica maior

disfunção mitocondrial. Os resultados obtidos evidenciam uma relação diretamente proporcional entre a concentração de AA e a disfunção mitocondrial, com significado estatístico para as três linhas celulares estudadas.

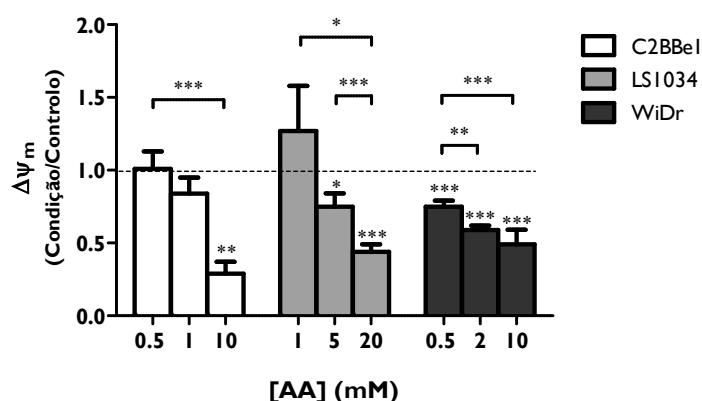


Figura 28: Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) das células das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados estão representados como razão agregados/monómeros (A/M) para cada condição relativamente ao controlo. A diminuição da razão A/M está diretamente correlacionada com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Os dados exprimem a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

A exposição das células C2BBe1 a 10 mM de AA induziu uma redução abrupta e significativa do  $\Delta\psi_m$ , sendo 3,4 vezes inferior ao controlo ( $p=0,001$ ) e à condição correspondente à concentração de 0,5 mM ( $p=0,0007$ ). Quando as células LS1034 foram tratadas com 20 mM de ácido ascórbico, o  $\Delta\psi_m$  foi  $0,44 \pm 0,05$ , revelando ser estatisticamente inferior ao controlo ( $p=0,0006$ ), e às células tratadas com 1 mM ( $p=0,035$ ) e com 5 mM ( $p=0,008$ ). Porém, as maiores alterações do  $\Delta\psi_m$  foram observadas nas células da linha celular WiDr após tratamento com AA. Para estas células, todas as concentrações testadas induziram uma diminuição estatisticamente significativa do potencial de membrana mitocondrial relativamente ao controlo, o qual apresentou um valor de  $0,75 \pm 0,04$  para a concentração de 0,5 mM de AA ( $p=0,0008$ ), um valor de  $0,59 \pm 0,03$  para a concentração de AA de 2 mM ( $p < 0,001$ ) e um valor de  $0,49 \pm 0,10$  para a concentração de 10 mM ( $p < 0,001$ ).

### Expressão de caspase-8 e caspase-9

Para confirmar o envolvimento das vias extrínseca e/ou intrínseca da apoptose no mecanismo de indução de morte celular pelo ácido ascórbico, avaliou-se a expressão de proteases intracelulares, nomeadamente a caspase-8 e a caspase-9, por *western blot*. Os resultados estão evidenciados na Figura 29 e na Figura 30.

Tal como evidenciado na Figura 29, na presença de AA não se observam alterações na expressão da caspase-8 em nenhuma das linhas celulares em estudo nem em nenhuma condição.

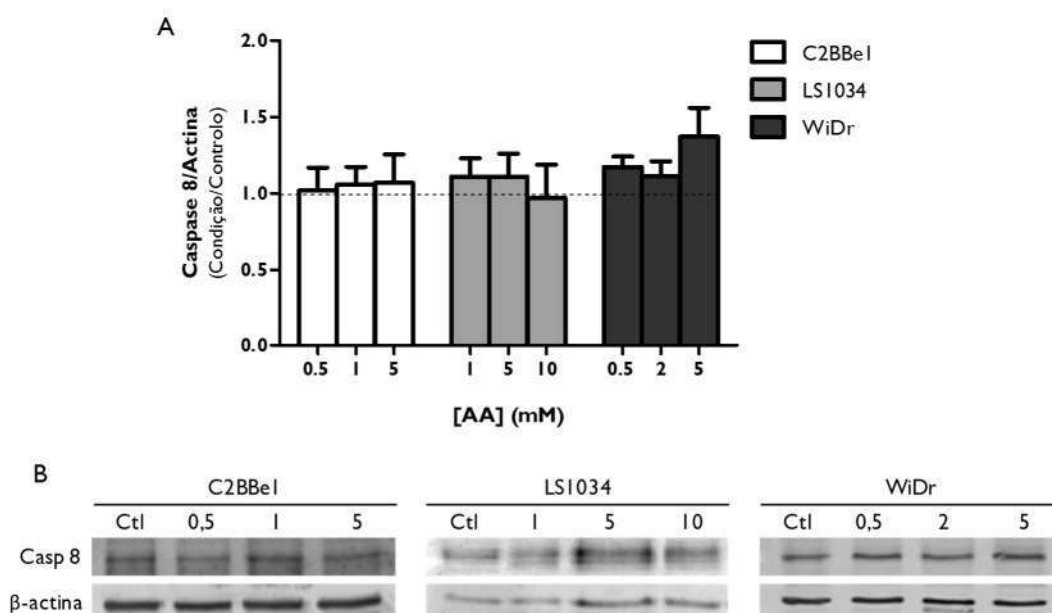


Figura 29: Expressão da caspase-8 pelas células das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. (A) O gráfico representa a expressão da caspase-8 sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de caspase-8 e de  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo. Os resultados exprimem a média e erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. (B) A fotografia representa o *immunoblot* ilustrativo da expressão de caspase-8 (banda correspondente a 55 kDa) e de  $\beta$ -actina para cada uma das linhas celulares e para cada condição experimental.

Em contraste, na presença de AA os níveis de expressão de caspase-9 (Figura 30) alteram-se, de forma dependente da linha celular e da concentração usada. Para a linha celular C2BBe1, todas as concentrações testadas, mostraram diminuição significativa da expressão da proteína de maior peso molecular (46 kDa) relativamente ao controlo,

com valores de  $0,69 \pm 0,05$  após tratamento com 0,5 mM de AA ( $p=0,007$ ), de  $0,34 \pm 0,07$  após tratamento com 1 mM ( $p=0,001$ ) e de  $0,44 \pm 0,07$  após tratamento com 5 mM ( $p=0,003$ ). Esta redução foi acompanhada pelo aumento da expressão da proteína clivada com 35 kDa, de forma dependente da concentração de AA, com valores de razão proteína clivada/actina de  $1,20 \pm 0,05$  após tratamento com 0,5 mM de AA ( $p=0,041$ ) e de  $1,53 \pm 0,11$  após tratamento com 5 mM ( $p=0,046$ ). Quanto à linha celular LS1034, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas quando as células foram tratadas com 10 mM de AA, com a diminuição da expressão da proteína de menor peso molecular (35 kDa) para valores de  $0,53 \pm 0,05$  ( $p=0,010$ ). Na linha celular WiDr, as maiores concentrações de AA testadas induziram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão da proteína de maior peso molecular (46 kDa), obtendo-se valores de  $0,60 \pm 0,04$  para o tratamento com 2 mM de AA ( $p<0,001$ ) e de  $0,51 \pm 0,05$  ( $p<0,001$ ) para o tratamento com 5 mM, assim como uma redução para metade da proteína clivada (35 kDa) após tratamento com 5 mM de AA ( $p=0,012$ ).

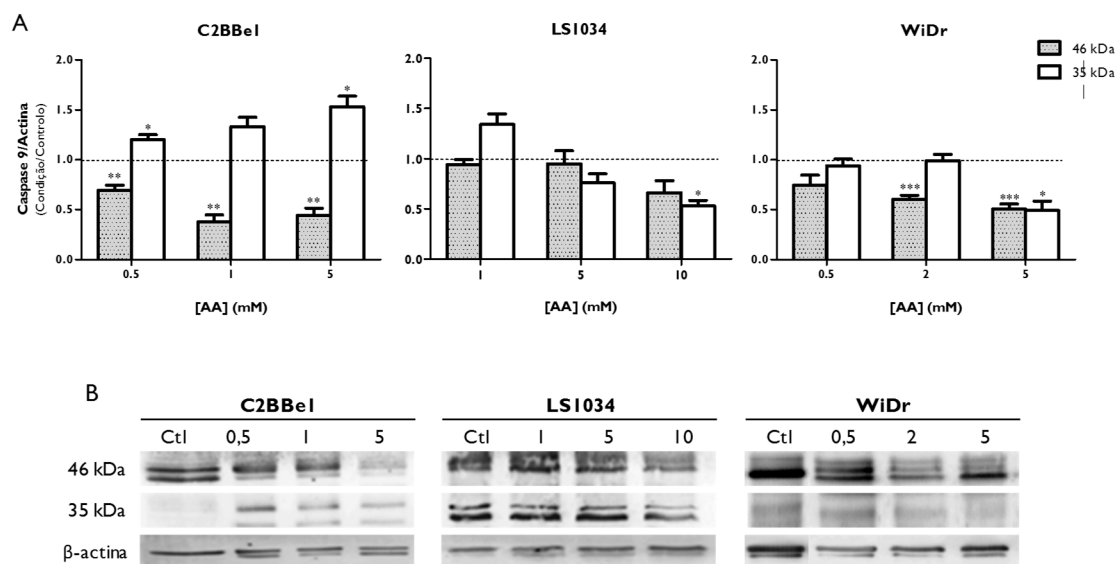


Figura 30: Expressão da caspase-9 pelas células das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. (A) O gráfico representa a expressão de caspase-9 (46 kDa) e de um produto de clivagem de peso molecular de 35 kDa. Os resultados estão sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de caspase-9 e de  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controle. Os resultados exprimem a média e erro padrão de, pelo menos, seis experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ . (B) A fotografia representa o *immunoblot* ilustrativo da expressão de caspase-9 (bandas de 46 kDa e de 35 kDa) e de  $\beta$ -actina para cada uma das linhas celulares e para cada condição experimental.

### *Genotoxicidade*

A extensão das lesões a nível do DNA após exposição das células ao ácido ascórbico foi avaliada com recurso ao ensaio cometa. A análise dos resultados obtidos foi feita de forma qualitativa pela análise visual das imagens e de forma quantitativa através da determinação do momento de cauda. Este parâmetro representa o produto entre a percentagem de DNA na cauda e o comprimento da cauda do cometa, o que permite uma análise em termos de extensão e de quantidade de lesões a nível do DNA, respetivamente (Olive & Banáth, 2006).

As imagens representativas dos resultados do ensaio cometa estão evidenciadas na Figura 31. Pela análise qualitativa das imagens, observa-se claramente em todas as linhas celulares que, na ausência de AA (condição controlo), o DNA forma esferas densas e compactas sem arrastamento de fragmentos, o que se traduz pela não existência de cauda. Contrariamente, como consequência do tratamento com AA observa-se uma distribuição assimétrica do DNA com a formação de cometas com cauda à direita. Em todas as linhas celulares, verificou-se o favorecimento da extensão das lesões do DNA com o aumento da concentração de AA.

Na Figura 32 estão apresentados os resultados da análise semi-quantitativa dos vários parâmetros que podem ser extraídos das imagens dos cometas representados na Figura 31. Verifica-se assim que a resposta ao tratamento com AA é semelhante em todas as linhas celulares, pois quanto maior a concentração de AA, maior o comprimento da cauda (Figura 32 (A)) e a percentagem de DNA na cauda (Figura 32 (B)).

Quando as células C2BBel foram tratadas com 3 mM de AA, as lesões do DNA revelaram-se de forma mais evidente a nível da percentagem de DNA na cauda, observando-se um aumento para  $30,7 \pm 1,9\%$  relativamente ao controlo. Nas células da linha celular LS1034, 10 mM de AA induziram lesões no DNA, mais notórias a nível da percentagem de DNA na cauda, parâmetro que aumentou para  $24,1 \pm 1,4\%$ . Nas células



da linha celular WiDr, 5 mM de AA induziram o aumento do comprimento da cauda para  $23,1 \pm 1,4$  px e da percentagem de lesões na cauda para  $25,4 \pm 1,3\%$ .

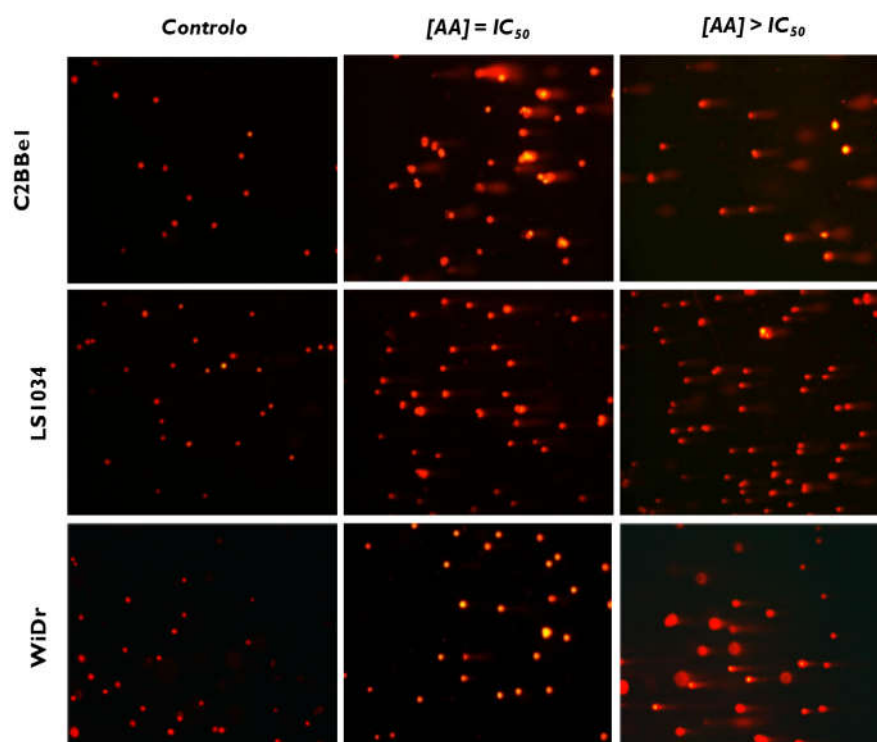
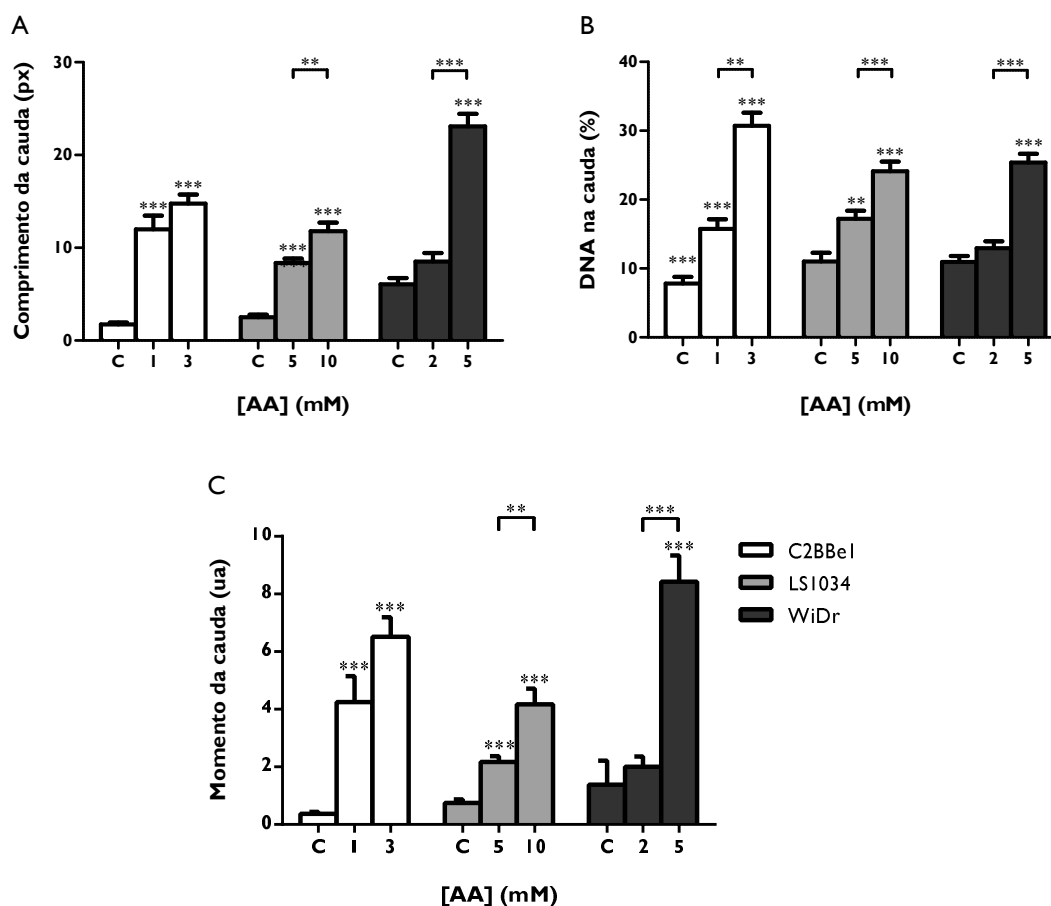


Figura 31: Lesões no DNA nas células das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr. As imagens ilustram os cometas obtidos na ausência de AA (Controlo) e após exposição ao AA durante 24 horas, na concentração correspondente ao IC<sub>50</sub> de cada linha celular ([AA]=IC<sub>50</sub>) e numa concentração superior a essa ([AA]>IC<sub>50</sub>). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 400x.

Estes resultados refletiram-se no aumento do momento da cauda (Figura 32 (C)) igualmente de forma dependente da concentração de AA. Nas células da linha celular C2BBe1, com 1 mM de AA o momento da cauda aumentou significativamente cerca de 4 vezes ( $p < 0,001$ ) e com 3 mM cerca de 7 vezes ( $p < 0,001$ ), relativamente ao controlo. O mesmo se verificou nas células da linha celular LS1034, com um aumento significativo do momento da cauda para o dobro com 5 mM de AA ( $p < 0,001$ ) e para o quádruplo com 10 mM ( $p < 0,001$ ). Quanto às células WiDr, observou-se que, após exposição a 5 mM de AA, o momento da cauda foi cerca de 8 vezes superior ao controlo ( $p < 0,001$ ) e 6 vezes superior ao observado nas células tratadas com 2 mM de AA ( $p < 0,001$ ).



0

Figura 32: Lesões do DNA nas células das linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. (A) Comprimento da cauda, (B) percentagem de DNA na cauda e (C) momento de cauda obtidos para as populações celulares presentes em cada condição. Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, 145 cometas contados em, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

### Stresse oxidativo

O stresse oxidativo tem sido descrito como um dos principais intervenientes no mecanismo de citotoxicidade do ácido ascórbico. Desta forma, as alterações do ambiente redox das células das linhas celulares em estudo, como consequência do tratamento com AA durante 24 horas, foram caracterizadas em termos da presença intracelular de radical superóxido e de peróxidos, da expressão de GSH e da atividade da enzima SOD, da sensibilidade ao  $H_2O_2$  e do efeito da presença de inibidores de stresse oxidativo na citotoxicidade do AA, nomeadamente a catalase (neutralizador do  $H_2O_2$ ) e

o manitol (inibidor do OH<sup>•</sup>).

A Figura 33 evidencia os efeitos no AA na produção intracelular de radical superóxido pelas células de todas as linhas celulares em estudo. Como se pode observar, os efeitos do AA dependem da sua concentração e da linha celular. Assim, quando as células C2BBel foram tratadas com 10 mM de AA observou-se um aumento na produção intracelular de radical superóxido, que atingiu o valor de  $1,44 \pm 0,40$ , que é estatisticamente significativo em comparação com as células tratadas com 0,5 mM ( $p < 0,001$ ) e com as tratadas com 1 mM ( $p = 0,030$ ). O mesmo foi observado nas células da linha celular WiDr, em que quanto maior a concentração de AA, maior a produção intracelular de radical superóxido. A maior concentração testada induziu um aumento desta espécie radical para valores da mesma ordem de grandeza aos obtidos nas células da linha celular C2BBel ( $1,49 \pm 0,15$ ), com diferenças estatísticas relativamente ao controlo ( $p = 0,048$ ) e à menor concentração de AA ( $p = 0,010$ ). Quanto às células da linha celular LS1034 não se verificaram alterações estatisticamente significativas na produção de radical superóxido em resposta ao tratamento com AA.

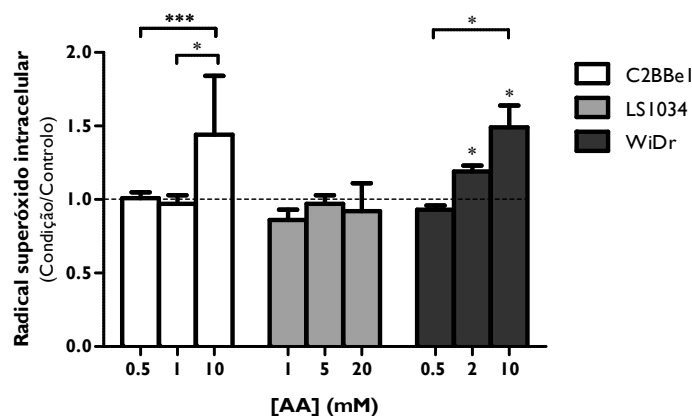


Figura 33: Produção intracelular de radical superóxido pelas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados estão representados com normalização relativamente ao controlo e exprimem a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

A produção intracelular de peróxidos em resposta ao tratamento com ácido ascórbico pode ser observada na Figura 34. Pela sua análise podemos verificar que o AA

apenas induz alterações estatisticamente significativas nas células C2BBe1. Nesta linha celular, observa-se um decréscimo significativo na produção intracelular desta ROS com o aumento da concentração de AA, sendo esta diminuição para cerca de metade nas células tratadas com 1 mM ( $p=0,030$ ) e de quase 100% quando as células são tratadas com 10 mM ( $p<0,001$ ) em comparação com o controlo. A produção intracelular de peróxidos pelas células LS1034 e WiDr não é significativamente influenciada pela presença de AA.

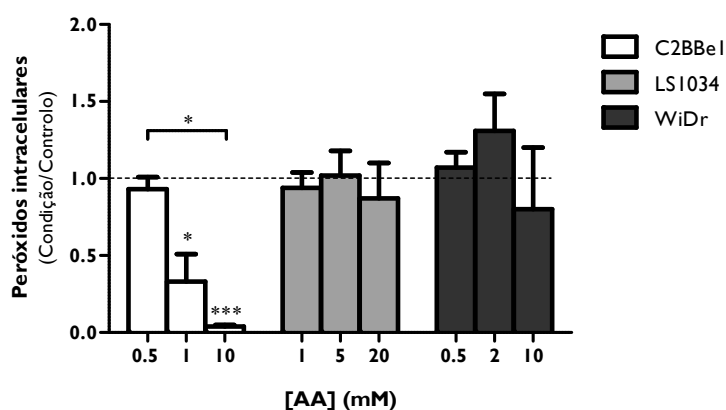


Figura 34: Produção intracelular de peróxidos pelas células das linhas celulares C2BBe1, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados estão representados com normalização relativamente ao controlo e exprimem a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

Quanto aos níveis de expressão da defesa antioxidante GSH, após tratamento com ácido ascórbico, que se encontram representados na Figura 35, de forma geral verificou-se uma diminuição significativa dos mesmos de forma dependente da concentração de AA, com exceção da linha celular LS1034. Quando as células C2BBe1 foram tratadas com a maior concentração de AA, os níveis de GSH diminuíram para metade, com significado estatístico relativamente ao controlo ( $p<0,001$ ) e também relativamente ao tratamento com a concentração de 0,5 mM ( $p=0,012$ ), a menor testada. Um comportamento semelhante foi observado com as células da linha celular WiDr, as quais mostraram um decréscimo da produção intracelular de GSH com o aumento da concentração de AA, com significado estatístico entre o controlo e o tratamento com

as concentrações mais elevadas ( $p=0,006$  para a concentração de 2 mM e  $p=0,012$  para a concentração de 10 mM) e entre os tratamentos com a concentração de 0,5 e de 10 mM ( $p=0,010$ ). A presença de AA não induziu alterações significativas a nível desta defesa antioxidante nas células da linha celular LS1034.

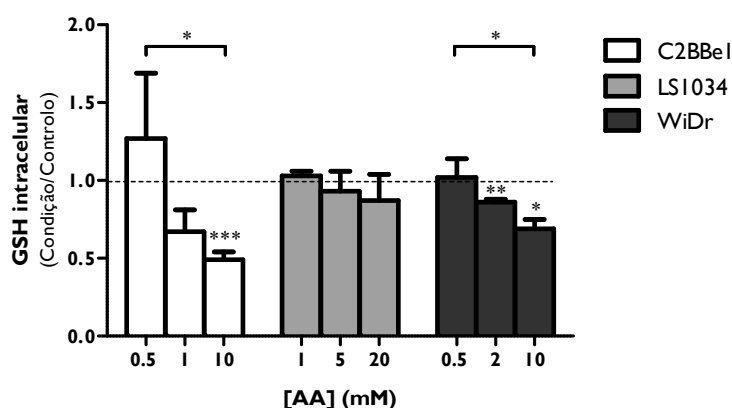


Figura 35: Expressão intracelular de GSH pelas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados estão representados com normalização relativamente ao controlo e exprimem a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

Quando avaliámos a atividade da enzima SOD, verificámos que aumentou quando as células C2BBel e WiDr foram tratadas com 10 mM de ácido ascórbico, tal como evidenciado na Figura 36. No caso das células C2BBel, este aumento atingiu o valor de  $3,42\pm 0,94$ , com significado estatístico relativamente ao controlo ( $p=0,016$ ), ao tratamento com a concentração de 0,5 mM ( $p=0,017$ ) e com a concentração de 1 mM de AA ( $p=0,036$ ). Nas células WiDr, 10 mM de AA induziram o aumento da atividade de SOD para valores de  $3,24\pm 0,44$ , com significado estatístico relativamente a todas as restantes condições ( $p<0,001$ ). Nas células da linha celular LS1034 não se verificaram alterações na atividade de SOD após exposição ao AA.

O mecanismo de ação proposto na literatura para o efeito citotóxico do ácido ascórbico nas células tumorais, coloca-o como principal intermediário na entrega de peróxido de hidrogénio às células que, por sua vez, irá ter uma ação lesiva sobre macromoléculas e organelos (Chen *et al*, 2005; Olney *et al*, 2013). Esta ação poderá ser

levada a cabo pelo peróxido de hidrogénio ou por espécies formadas posteriormente após a sua conversão. Uma das ROS que se forma a partir da conversão de peróxido de hidrogénio na presença de iões ferro é o radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), conhecido como o radical livre biologicamente mais ativo (Lipinski, 2011). Na impossibilidade de detetar o peróxido de hidrogénio a nível extracelular e os níveis de radical hidroxilo usaram-se inibidores específicos destas ROS, respetivamente a catalase e o manitol. Para além disso, estudou-se também a sensibilidade das células de cada linha celular ao peróxido de hidrogénio.

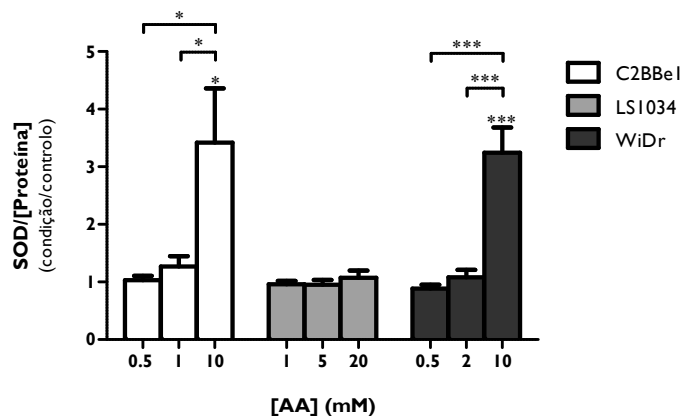


Figura 36: Atividade da enzima SOD nas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA durante 24 horas. Os resultados são expressos em razão entre a absorvância obtida e a concentração de proteína total, com normalização relativamente ao controlo. Os dados apresentados no gráfico exprimem a média e o erro padrão de, pelo menos, três experiências independentes, realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Na Figura 37 apresentam-se os resultados de proliferação celular após tratamento das células com ácido ascórbico isolado ou com a combinação de AA e catalase (inibidor do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e com a combinação de AA e manitol (inibidor do  $\text{OH}^\bullet$ ). Os respetivos valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos pelas curvas dose-resposta representadas estão evidenciados na Tabela 5.

Na linha celular C2BBel, quando as células foram tratadas com AA na presença de catalase, verificou-se um aumento do  $\text{IC}_{50}$  em comparação com o  $\text{IC}_{50}$  obtido nas células tratadas com AA em monoterapia. Nesta situação o valor de  $\text{IC}_{50}$  foi de 1,06 mM, enquanto na presença de catalase não foi possível calcular, ou seja, será sempre superior

à maior concentração de AA testada (>10 mM). Comparando o tratamento das células C2BBel com AA na presença e na ausência de manitol, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

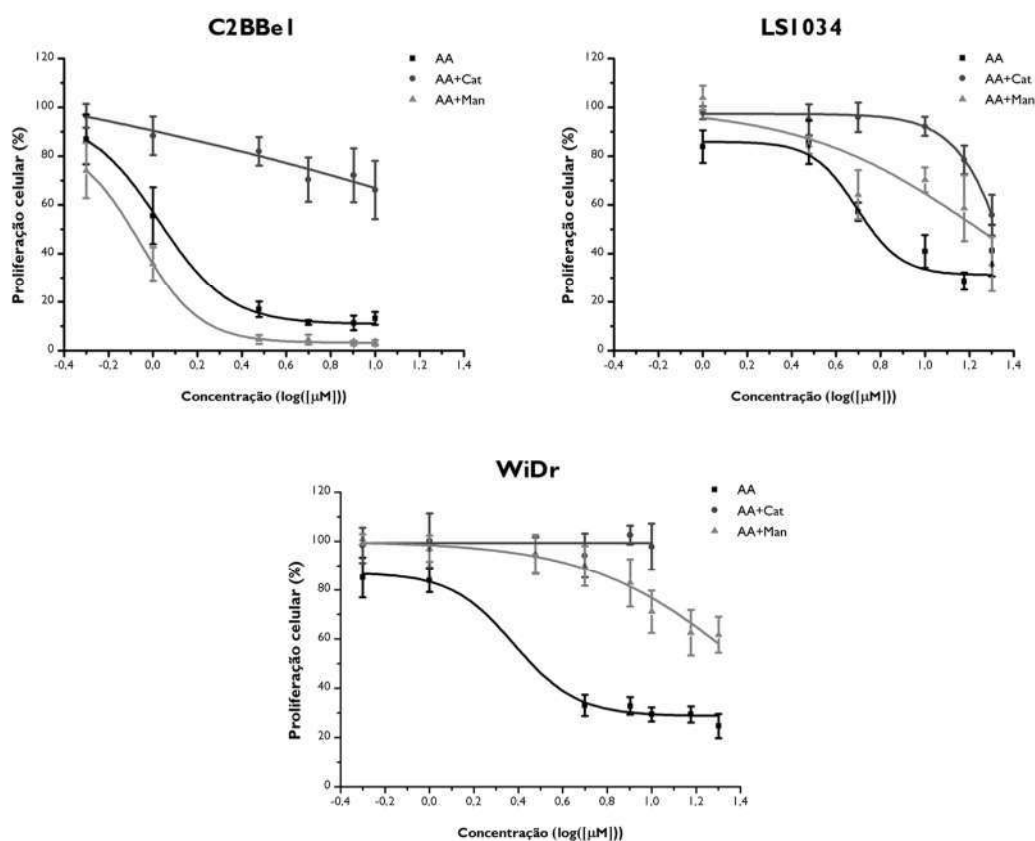


Figura 37: Curvas de dose-resposta das células das linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr após tratamento com e sem inibidores. As células foram tratadas com AA, AA e catalase (AA+Cat) ou AA e manitol (AA+Man), durante 24 horas. Os resultados representam a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da concentração de AA e expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em triplicado.

Quanto às células LSI034, observou-se que na presença de ambos os inibidores a proliferação celular foi superior para todas as concentrações de AA testadas em comparação com o tratamento isolado. Este facto repercutiu-se no aumento do valor dos  $IC_{50}$ . O valor de  $IC_{50}$  obtido após exposição ao AA isoladamente foi 4,94 mM, enquanto na presença de catalase não foi possível calcular (>20 mM) e na presença de manitol foi de 17,54 mM. Nas células WiDr observou-se uma resposta semelhante à das células LSI034, na medida em que, tanto com a catalase como com o manitol, a

proliferação celular foi superior à obtida quando as células são tratadas com AA em monoterapia (2,40 mM), em todas as condições testadas. Para ambos os inibidores, não foi possível determinar o valor de  $IC_{50}$ .

Na Figura 38 está representada a resposta das três linhas celulares após 24 horas de tratamento com  $H_2O_2$ . Os respectivos valores de  $IC_{50}$  apresentam-se na Tabela 5. De acordo com as curvas obtidas, observa-se que as três linhas celulares são sensíveis ao  $H_2O_2$ , tendo em conta que este induziu uma diminuição da proliferação celular de forma dependente da sua concentração. Os valores de  $IC_{50}$  obtidos variaram entre os 260 e os 300  $\mu M$ . Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as três linhas celulares.

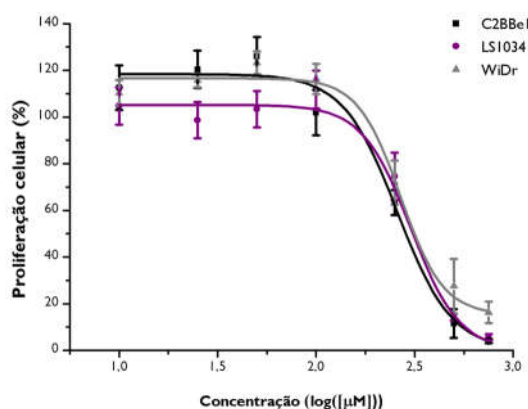


Figura 38: Curvas de dose-resposta das células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr em resposta à incubação com  $H_2O_2$ , durante 24 horas. Os resultados representam a proliferação celular em percentagem (%) em função do logaritmo da concentração de  $H_2O_2$  e expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, quatro experiências independentes em triplicado.

Tabela 5: Valores de  $IC_{50}$  obtidos após tratamento das células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr com AA, AA e catalase, AA e manitol e com  $H_2O_2$  durante 24 horas. Estão também representados os valores de  $r^2$ .

Tempo de Incubação (h)	C2BBel		LS1034		WiDr	
	$IC_{50}$ (mM)	$r^2$	$IC_{50}$ (mM)	$r^2$	$IC_{50}$ (mM)	$r^2$
AA	1,06	0,96	4,94	0,90	2,40	0,98
AA + Catalase	> 10	-	> 20	-	> 10	-
AA + Manitol	0,87	0,99	17,54	0,80	> 20	-
$H_2O_2$	0,26	0,99	0,30	0,99	0,27	0,98



## Expressão de P53

Para melhor entender os mecanismos envolvidos na ação citotóxica do AA, a expressão da proteína P53 foi avaliada por *western blot*, após tratamento com concentrações crescentes de AA durante 24 horas.

Um estudo anteriormente realizado por nós demonstrou que as células C2BBel não expressam a proteína P53 (Abrantes, 2013), tal como evidenciado também na Figura 39 (B). Em contraste, as células WiDr são as que evidenciam maior expressão basal desta proteína.

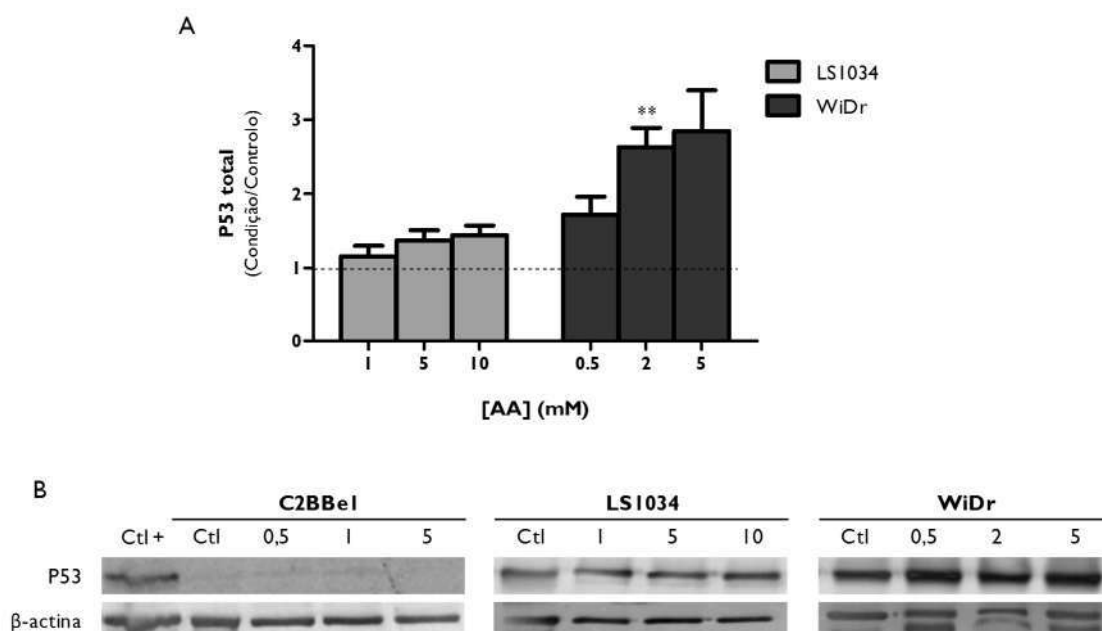


Figura 39: Expressão de P53 pelas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição a AA durante 24 horas. (A) O gráfico representa a expressão de P53 total, pelas células das linhas celulares LS1034 e WiDr, sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e de  $\beta$ -actina, normalizadas em relação ao controlo. Os resultados exprimem a média e erro padrão de, pelo menos, cinco experiências independentes. (B) A fotografia representa o *immunoblot* ilustrativo da expressão de P53 e de  $\beta$ -actina para cada uma das linhas celulares e para cada condição experimental. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \*\* significa  $p < 0,01$ .

O efeito do AA na expressão de P53 pelas células das linhas celulares LS1034 e WiDr representa-se quantitativamente na Figura 39 (A). De facto, o tratamento com AA não induziu alterações estatisticamente significativas na expressão de P53 total nas

células LS1034. Por outro lado, nas células WiDr verificou-se o aumento da expressão total da mesma proteína, de forma dependente da concentração, obtendo-se valores aproximadamente 3 vezes superiores ao controlo. Quando estas células foram expostas à concentração de 2 mM, a expressão de P53 foi de  $2,63 \pm 0,26$  e quando o tratamento foi com a concentração de 5 mM de AA a expressão de P53 foi de  $2,85 \pm 0,55$ , com significância estatística relativamente ao controlo para a concentração de AA de 2 mM ( $p=0,003$ ).

### Expressão de VEGF-R1

No que diz respeito à expressão de VEGF-R1, os resultados apresentados na Figura 40, mostram que a presença de ácido ascórbico não induziu alterações estatisticamente significativas nas células das linhas celulares C2BBel e WiDr. Após o tratamento das células LS1034 com a concentração de 1 mM de AA a expressão de VEGF-R1 foi de  $1,28 \pm 0,24$ , o que traduz um aumento significativo relativamente ao controlo ( $p=0,027$ ) assim como em relação ao tratamento com a concentração de 5 mM ( $p=0,006$ ). Contudo, este aumento não se verificou ser dependente da concentração de AA.

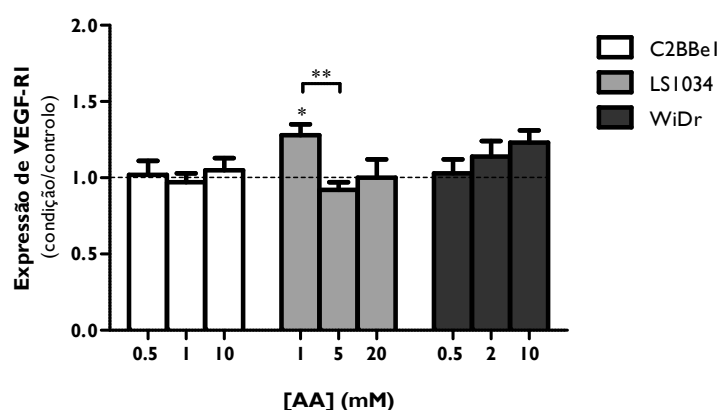


Figura 40: Expressão de VEGF-R1 nas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após tratamento com AA durante 24 horas. Os resultados são expressos em relação ao controlo e representam a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

### Expressão de PGP

A linha celular LS1034 caracteriza-se pela sua resistência a múltiplos fármacos, sendo um dos mecanismos propostos a sobre-expressão da PGP, uma glicoproteína de extrusão. Com a avaliação da expressão membranar desta proteína pretendeu-se averiguar se a PGP poderá estar implicada na menor sensibilidade das células LS1034 ao ácido ascórbico. Os resultados, apresentados na Figura 41, indicam que a expressão membranar desta proteína não é influenciada pela presença de AA, na medida em que a expressão de PGP em todas as condições testadas foi equiparada à do controlo, sem diferenças estatísticas entre elas.

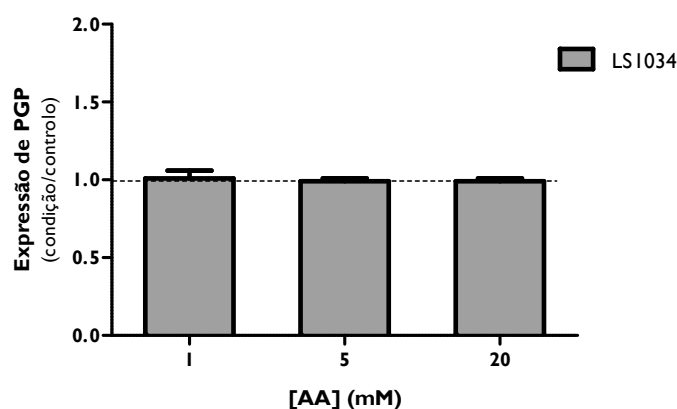


Figura 41: Expressão membranar de PGP pelas células da linha celular LS1034 após tratamento com AA durante 24 horas. Os resultados são expressos em relação ao controlo e representam a média e o erro-padrão de três experiências independentes em duplicado.

## Estudos de farmacocinética

A expressão dos transportadores que direta ou indiretamente transportam o ácido ascórbico para o interior das células tumorais em estudo foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 42, Figura 43 e Figura 44) e por *western blot* (Figura 45).

De uma forma geral, a análise dos níveis membranares basais dos GLUTs estudados (Figura 42 (A)) revelou que as células em estudo evidenciam uma maior expressão de GLUT-1 em relação à expressão de GLUT-3. Nas células C2BBel a

expressão de GLUT-1 foi quatro vezes superior à de GLUT-3 ( $p=0,003$ ), nas células LSI034 foi três vezes superior ( $p=0,001$ ) e nas células WiDr foi sete vezes superior ( $p<0,001$ ). De acordo com os dados obtidos, as células da linha celular LSI034 são as que apresentam menor expressão de GLUT-1 ( $618,3\pm 78,2$  MIF) e maior expressão de GLUT-3 ( $223,5\pm 18,3$  MIF), enquanto as células da linha celular WiDr são as que possuem maior expressão de GLUT-1 ( $965,0\pm 193,7$  MIF) e menor expressão de GLUT-3 ( $129,7\pm 10,5$  MIF).

No que diz respeito à expressão de SVCTs (Figura 42 (B)) verificou-se que a linha celular LSI034 possui uma expressão de SVCT-1 ( $47,0\pm 7,5$  MIF) duas vezes superior à de SVCT-2 ( $22,4\pm 1,8$  MIF;  $p=0,013$ ). De realçar que as células WiDr são as que menos expressam este tipo de transportadores.

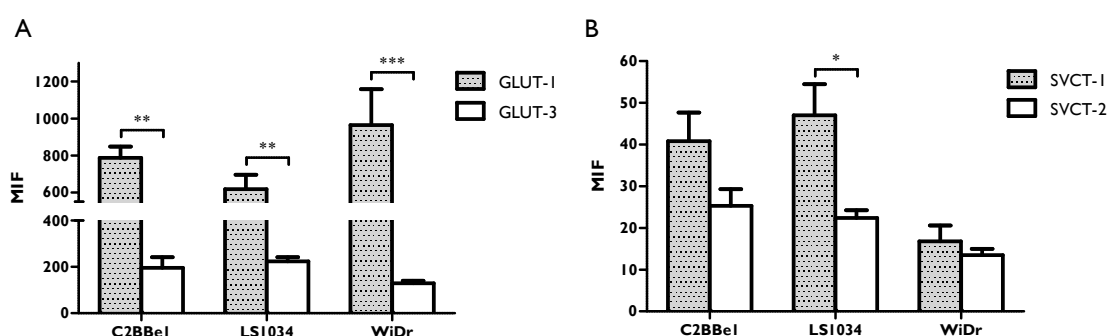


Figura 42: Expressão membranar basal de GLUT-1 e GLUT-3 (A) e de SVCT-1 e SVCT-2 (B) pelas células das linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr, por citometria de fluxo. Os níveis de expressão estão apresentados em termos de MIF e representam a média e o erro-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

Em resposta ao tratamento com ácido ascórbico, os níveis de expressão de GLUTs em relação ao controlo alteraram-se na maioria das condições, tal como evidenciado na Figura 43. Quando as células C2BBel foram tratadas com a concentração de 10 mM de AA, a expressão de GLUT-1 aumentou para o dobro em relação ao controlo e a todas as restantes condições ( $p=0,006$ ), assim como a expressão de GLUT-3, mas aqui sem significado estatístico. Na linha celular LSI034 não se verificaram alterações na expressão de GLUT-1, contudo, a expressão de GLUT-3 aumentou cerca de quatro vezes em relação ao controlo quando tratada com as concentrações de 5 mM

( $p < 0,001$ ) e de 20 mM ( $p = 0,034$ ). Quanto às células WiDr, após tratamento com a concentração de 10 mM, a expressão de GLUT-1 foi 1,5 vezes superior ( $p = 0,009$ ) e a de GLUT-3 quadruplicou ( $p = 0,008$ ) em relação ao controlo.

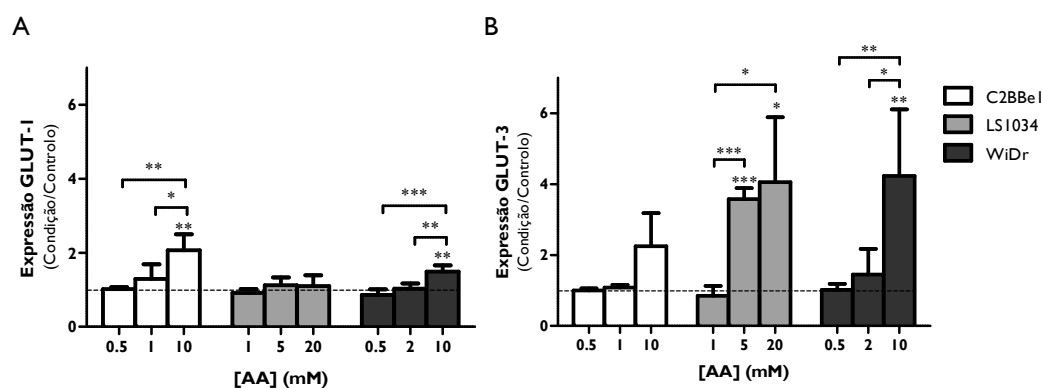


Figura 43: Expressão membranar de GLUT-1 (A) e GLUT-3 (B) pelas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após tratamento com AA durante 24 horas. A análise foi feita por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em relação ao controlo e representam a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Tal como evidenciado na Figura 44, a presença de AA influenciou igualmente a expressão membranar de SVCTs, exceto nas células da linha celular WiDr. Assim, nas células C2BBel tratadas com a concentração de 10 mM de AA observou-se um aumento na expressão de SVCT-1 para  $2,4 \pm 0,7$  ( $p = 0,013$  relativamente ao controlo). Por outro lado, verificou-se que o AA induziu um aumento da expressão de SVCT-2 de forma dependente da concentração, na medida em que a maior concentração de AA testada aumentou a expressão deste transportador, para mais do triplo, nas células C2BBel ( $3,6 \pm 0,5$ ;  $p = 0,005$ ) e para o dobro nas células LS1034 ( $2,1 \pm 0,5$ ;  $p = 0,005$ ) comparativamente com o controlo. Este aumento foi também estatisticamente significativo em relação às restantes condições avaliadas.

A expressão dos SVCTs nas linhas celulares tumorais em estudo foi confirmada com recurso à técnica de *western blot*, resultados apresentados na Figura 45. Esta análise mostrou também que o ácido ascórbico influenciou a expressão de SVCTs, contudo, variaram com a linha celular.

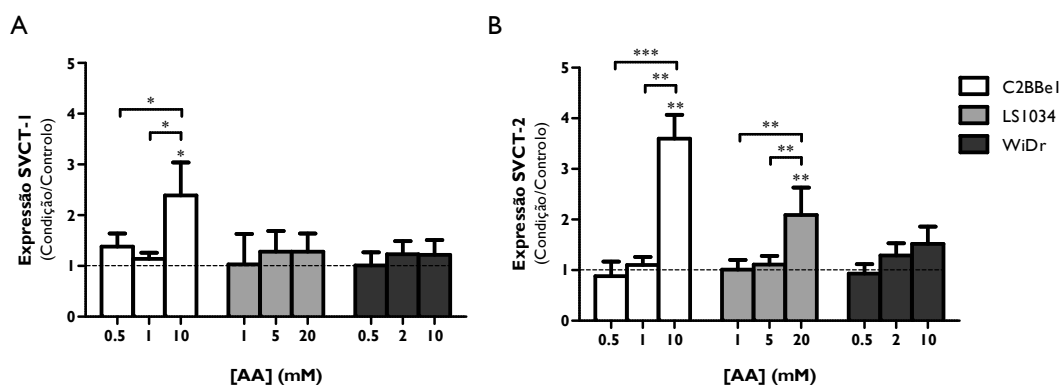


Figura 44: Expressão membranar de SVCT-1 (A) e SVCT-2 (B) pelas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após tratamento com AA durante 24 horas. A análise foi feita por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em relação ao controlo e representam a média e o erro-padrão de, pelo menos, duas experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Nas células C2BBel não se verificaram alterações dependentes do aumento da concentração de AA na expressão de ambos os SVCTs. A metodologia aplicada para avaliação da expressão de SVCT-1 na linha celular C2BBel não permitiu a obtenção de resultados consistentes para a maior concentração de AA testada (5 mM), tendo-se observado uma elevada discrepância de resultados entre as várias experiências independentes. À semelhança do observado nos estudos de citometria de fluxo, quando as células LS1034 são tratadas com a concentração de 10 mM de AA, a expressão de SVCT-2 aumentou estatisticamente para  $2,11 \pm 0,17$  ( $p < 0,001$  relativamente às restantes condições). Nas células da linha celular WiDr, contrariamente ao observado nos estudos anteriores, a presença de AA induziu um aumento na expressão de SVCT-1, assim como na expressão de SVCT-2. Quando as células foram tratadas com a concentração de 2 mM de AA, a expressão de SVCT-1 aumentou para  $1,54 \pm 0,17$  ( $p = 0,002$  relativamente às células não tratadas) e com a concentração de 5 mM aumentou para  $1,44 \pm 0,13$  ( $p = 0,020$  relativamente às células não tratadas). Do mesmo modo, o tratamento das células WiDr com as concentrações de 2 mM e de 5 mM de AA induziu um aumento na expressão de SVCT-2 para cerca do triplo relativamente ao controlo ( $p = 0,011$  e  $p = 0,038$ , respetivamente).

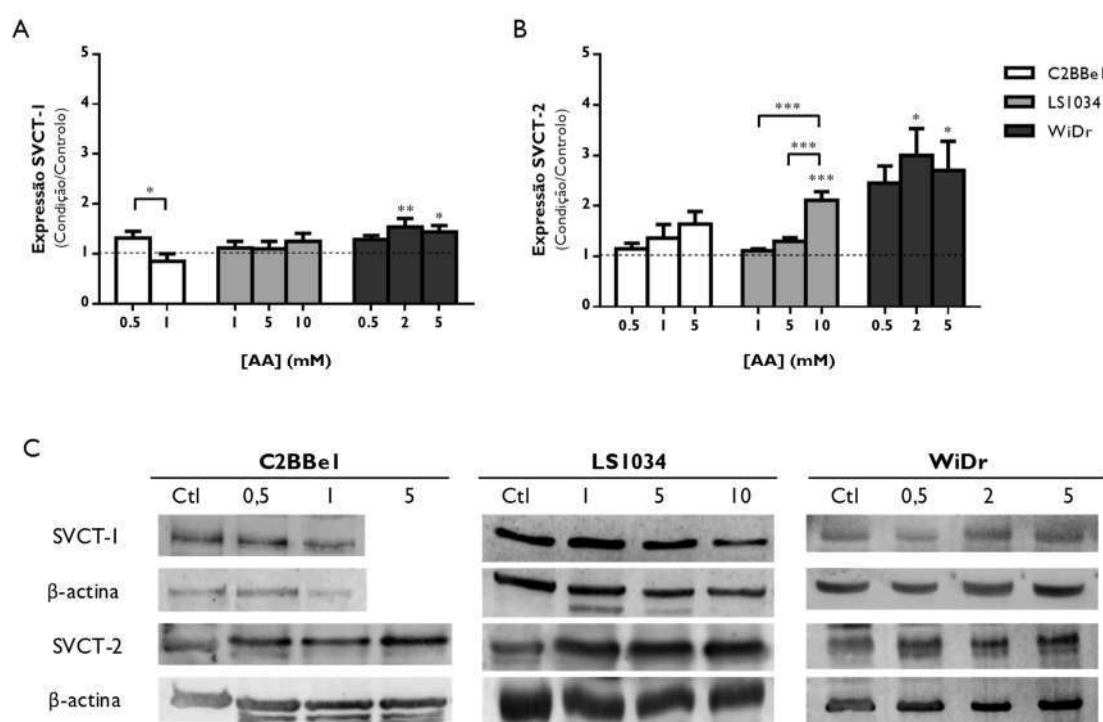


Figura 45: Expressão de SVCT-1 (A) e SVCT-2 (B) pelas células das linhas celulares C2BBel, LS1034 e WiDr após tratamento com AA durante 24 horas. A análise foi feita por *western blot*. Os gráficos (A) e (B) representam a expressão de SVCT-1 e SVCT-2, respetivamente, sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência do respetivo transportador e de  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo. Os resultados exprimem a média e erro padrão de pelo menos quatro experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ . (C) O esquema representa o *immunoblot* ilustrativo da expressão de SVCT-1 e -SVCT2 e de  $\beta$ -actina para células de cada uma das linhas celulares e para as condições experimentais.

Com o intuito de realizar estudos de influxo e de quantificar a captação do ácido ascórbico pelas células das linhas celulares em estudo, foi obtido o complexo radiomarcado  $^{99m}\text{Tc-AA}$ . Após a radiomarcagem, a pureza radioquímica foi avaliada por HPLC, tendo-se obtido as eficiências de marcação apresentadas na Tabela 6. Os cromatogramas foram analisados tendo por base os tempos de retenção dos diferentes componentes da formulação anteriormente determinados (Pires, 2008; Mamede *et al*, 2012a). A eficiência de marcação foi determinada por integração gráfica e normalização das áreas dos picos do complexo  $^{99m}\text{Tc-AA}$  e do pertecnetato livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ). Após 30 minutos, a eficiência de marcação manteve-se estável ao longo do tempo, assumindo valores sempre superiores a 90%.

Tabela 6: Eficiência de marcação do  $^{99m}\text{Tc-AA}$  ao longo do tempo. Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de pelo menos três experiências independentes, excetuando o tempo 180 minutos.

Tempo (min)	0	30	60	120	180
Eficiência de marcação	88,2±3,8	92,5±3,1	95,5±2,6	92,0±3,2	91,9±5,8

Após a obtenção de uma formulação com elevada eficiência de marcação, foi possível traçar os perfis de captação do  $^{99m}\text{Tc-AA}$  ao longo do tempo pelas três linhas celulares em estudo. A captação percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  foi igualmente determinada para comparação. As curvas de captação obtidas para cada linha celular estão representadas na Figura 46.

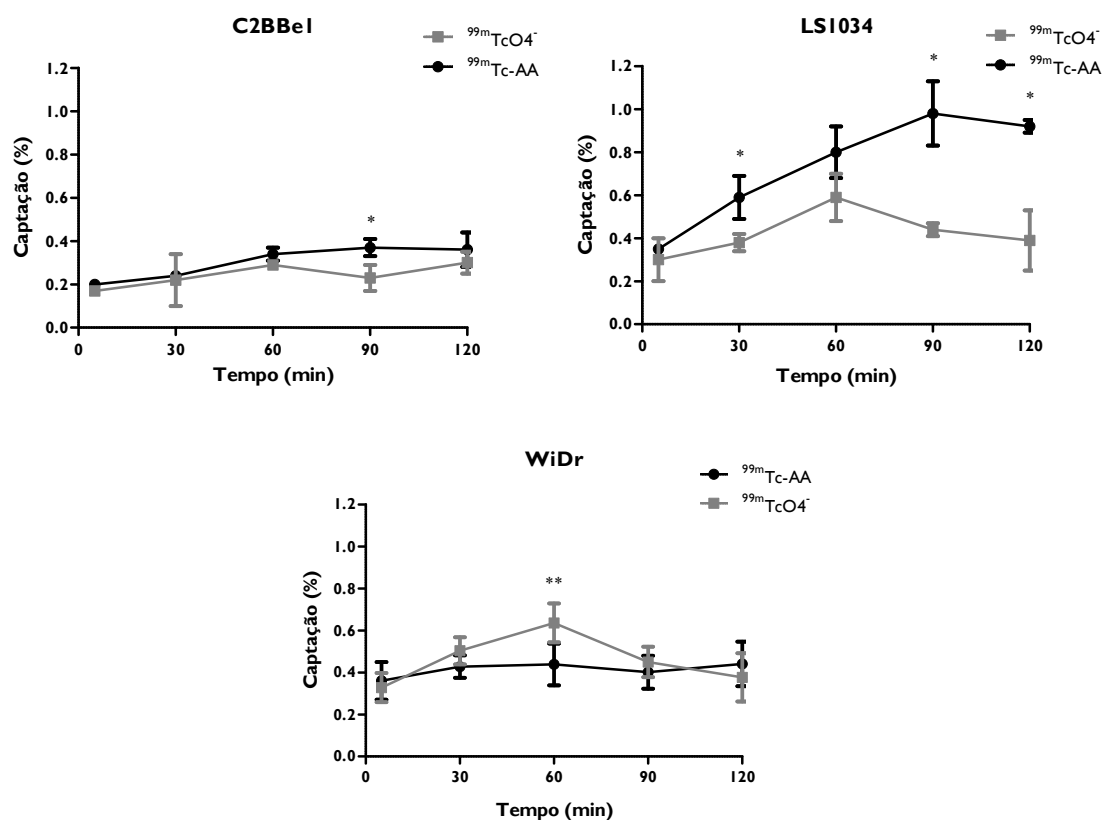


Figura 46: Percentagem de captação de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  e de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  pelas células das linhas celulares C2BBel, LSI034 e WiDr. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas entre compostos estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .



As diferenças mais notórias entre a captação de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  e de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  foram observadas nas células da linha celular LSI034. Nas células da linha celular C2BBel, a captação máxima de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  foi  $0,34 \pm 0,04\%$  aos 90 minutos, sendo este o único tempo com diferenças significativas relativamente ao  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  ( $p=0,034$ ). Nas células da linha celular LSI034, ao longo dos 120 minutos, a captação de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  foi sempre superior à captação de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , com diferenças significativas aos 30 ( $p=0,034$ ), aos 90 ( $p=0,034$ ) e aos 120 minutos ( $p=0,034$ ). Neste caso, o pico de captação de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  foi obtido aos 90 minutos ( $0,98 \pm 0,15\%$ ), sendo o valor percentual de captação neste tempo 2 vezes superior ao de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Nas células da linha celular WiDr, a captação de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  foi superior à de  $^{99m}\text{Tc-AA}$  aos 60 minutos ( $p=0,006$ ), não se verificando diferenças significativas nos restantes tempos.

## DISCUSSÃO

A vitamina C foi inicialmente sugerida como uma abordagem terapêutica para o cancro nos anos 50, com base na hipótese de que a deficiência de vitamina C está implicada em vários processos precursores de malignidade e de metastização (McCormick, 1959). Vários autores descreveram que os doentes oncológicos possuem frequentemente níveis reduzidos de vitamina C (Riordan *et al*, 2005; Mikirova *et al*, 2013), sugerindo que a utilização de infusões contínuas de vitamina C poderá melhorar a função do sistema imunitário, assim como, a qualidade de vida e o bem-estar do doente (Kumar *et al*, 2015).

O racional por detrás do uso de concentrações farmacológicas de vitamina C no tratamento do cancro pode ser sumariado em cinco aspetos. Primeiramente, concentrações plasmáticas de ascorbato na ordem dos mM são atingíveis com segurança com infusões de vitamina C por via intravenosa. Em segundo, em concentrações na ordem dos milimolar, o ascorbato é preferencialmente tóxico para as células tumorais *in vitro* e tem a capacidade de inibir a angiogénese. Em terceiro, a vitamina C pode

acumular-se nos tumores induzindo uma inibição significativa do crescimento tumoral. Em quarto, estudos de caso publicados reportaram a eficácia anti-tumoral da vitamina C, com evidências na melhoria do bem-estar do doente, na diminuição de marcadores de inflamação e na inibição do crescimento tumoral. E em quinto, ensaios clínicos de fase I indicam que concentrações farmacológicas de vitamina C administradas por via i.v. podem ser administradas de forma segura, com efeitos adversos relativamente reduzidos (Mikirova *et al*, 2013).

Apesar das vantagens amplamente descritas associadas ao uso da vitamina C no tratamento do cancro, a literatura é muito escassa no que diz respeito ao cancro colorretal. Desta forma, torna-se imprescindível avaliar o potencial desta terapia no tratamento do cancro colorretal através do estudo do efeito de concentrações elevadas de vitamina C no crescimento e na progressão tumoral e através do conhecimento dos seus mecanismos de ação. A manutenção de taxas de elevada incidência de cancro colorretal forçam também ao desenvolvimento de novas e mais eficazes ferramentas terapêuticas (DeSantis *et al*, 2014).

Este tópico de discussão será dividido em duas partes, de acordo com os parâmetros experimentais avaliados neste capítulo, nomeadamente, a citotoxicidade e os mecanismos de ação do AA envolvidos na morte celular, e os estudos de farmacocinética do AA.

## **Citotoxicidade do ácido ascórbico**

As células tumorais são reconhecidas pela sua proliferação anormal e pela sua capacidade de superar os mecanismos de controlo habituais, o que as distingue das células normais (Knowles & Selby, 2005). O ensaio SRB, inicialmente desenvolvido por Skehan e seus colegas (Skehan *et al*, 1990), possibilita a quantificação da citotoxicidade induzida por fármacos, a partir da medida da proliferação celular (Voigt, 2005). Pela determinação do conteúdo proteico total, o qual é diretamente proporcional à proliferação celular, este ensaio permitiu avaliar a resposta das três linhas celulares de

cancro colorretal a concentrações de ácido ascórbico da ordem dos milimolar e, conseqüentemente, a obtenção de curvas de dose-resposta e o cálculo da concentração inibitória média, designada por IC<sub>50</sub>.

Evidências anteriormente reportadas mostram que elevadas concentrações de AA induzem um efeito citotóxico em vários tipos de células tumorais (Riordan *et al*, 1995; Chen *et al*, 2005, 2008a; Klingelhoefter *et al*, 2012; Gonçalves *et al*, 2013; Kawada *et al*, 2013; Mastrangelo, 2013; Mastrangelo *et al*, 2013, 2015; Fukui *et al*, 2015). Os nossos estudos de citotoxicidade sugeriram também que o AA inibe a proliferação celular das três linhas celulares de cancro colorretal, de um modo dependente da linha celular e da concentração de AA, no entanto, de forma independente do tempo de incubação.

Os valores de IC<sub>50</sub> por nós obtidos e exibidos na Tabela 4, indicam que a linha celular C2BBel é a mais sensível ao AA, com valores de IC<sub>50</sub> que variam entre os 0,65 mM e os 0,95 mM. Em contraste, a linha celular LSI034 é a mais resistente a concentrações elevadas de AA, com valores de IC<sub>50</sub> que variam entre os 4,33 mM e os 9,11 mM. Chen e seus coautores expuseram 25 linhas celulares tumorais humanas ao AA durante 2 horas, e obtiveram valores de IC<sub>50</sub> superiores a 20 mM em 7 delas, valores de IC<sub>50</sub> que variaram entre os 5 mM e os 12 mM em outras 7 e valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 5 mM em 11 delas (Chen *et al*, 2008a). Este facto aliado aos valores de IC<sub>50</sub> obtidos por nós nas linhas celulares de cancro colorretal evidenciam o potencial anti-proliferativo do AA neste tipo de cancro.

As concentrações de AA que utilizámos ao longo das experiências discutidas mais à frente tiveram por base os valores de IC<sub>50</sub> obtidos às 24 horas, após a realização do ensaio SRB em cada linha celular. Desta forma, as condições escolhidas corresponderam a uma concentração de AA inferior, outra aproximadamente igual e outra superior ao IC<sub>50</sub> obtido para cada linha celular.

O aumento significativo dos valores de IC<sub>50</sub>, em tempos mais longos de exposição ao AA nas células das linhas celulares LSI034 e WiDr, conduziu à necessidade de avaliar o efeito citotóxico do AA a longo prazo. Para tal, utilizou-se o ensaio clonogénico cuja

análise permitiu determinar o fator de sobrevivência das células após exposição ao AA. Assim, observou-se que à medida que a concentração de AA aumenta, o fator de sobrevivência diminui. Este facto foi notoriamente observado na linha celular quimiorresistente LS1034, indicando que a exposição prolongada ao AA enfraquecerá possíveis mecanismos de defesa das células resistentes. Também *Du* e seus coautores avaliaram os efeitos do ascorbato a longo prazo, após exposição de duas linhas celulares de cancro pancreático ao ascorbato durante 1 hora. Os resultados obtidos por estes autores mostram que a sobrevivência celular diminuiu de forma dependente da concentração de ascorbato (*Du et al*, 2010).

Em organismos multicelulares, a proliferação e a morte celulares deverão ser reguladas com o intuito de manter a homeostase dos tecidos. Esta regulação é alcançada pelo acoplamento entre o processo de progressão do ciclo celular e a morte celular controlada (*Hughes & Mehmet*, 2003).

O efeito do AA nas células de cancro colorretal foi por nós estudado em ambos os processos. Primeiramente, as alterações induzidas por elevadas concentrações de AA a nível do ciclo celular variaram de acordo com a linha celular. Na linha celular C2BBel verificou-se um bloqueio na fase S do ciclo celular, concordante com a diminuição da proliferação celular. Foi igualmente visível o aumento do pico apoptótico. *Lin* e seus coautores estudaram o efeito do ascorbato de sódio numa linha celular de melanoma e verificaram que aquele induziu a inibição da proliferação celular de forma concomitante com o bloqueio do ciclo celular na fase S (*Lin et al*, 2006). Este facto foi também por nós observado na linha celular LS1034, assim como o aumento do pico apoptótico com o aumento da concentração de AA. Na linha celular WiDr não verificámos alterações na distribuição celular pelas diferentes fases do ciclo celular de forma dependente da concentração de AA. Neste caso, a inibição da proliferação celular poderá estar associada à diminuição da viabilidade celular, aspeto discutido posteriormente.

Paralelamente, a viabilidade e os tipos de morte celular induzidos foram por nós avaliados com recurso à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo e à coloração *May-Grünwald-Giemsa* para análise morfológica. A anexina V liga-se à fosfatidilserina, um fosfolípido da membrana que se externaliza durante o processo

apoptótico. A necrose é estimada pela marcação positiva de iodeto de propídeo, o qual se intercala no DNA quando a membrana celular está desintegrada. A dupla marcação com anexina e iodeto de propídeo permite a distinção de quatro populações celulares, nomeadamente, a das células viáveis, a das células em apoptose inicial, a das células em apoptose tardia/necrose e a das células em necrose. A técnica *May-Grünwald-Giemsa* complementa os dados obtidos com a dupla marcação com AV e com IP pela análise da morfologia das células após utilização de dois corantes, um com afinidade para o citoplasma e outro com afinidade para o núcleo. Nas células apoptóticas, as alterações morfológicas são predominantes no compartimento nuclear, iniciando com a condensação da cromatina seguida de fragmentação nuclear. Protuberâncias da superfície celular separam-se da membrana plasmática, convertendo a célula em numerosos corpos apoptóticos, que poderão ou não conter fragmentos nucleares. Em contraste, a característica morfológica mais evidente na morte celular por necrose é a disrupção precoce da membrana plasmática, com o extravasamento dos conteúdos celulares para o meio extracelular. No núcleo, a cromatina condensa-se em aglomerados mal definidos como resultado da degradação aleatória do DNA nuclear (Hughes & Mehmet, 2003).

Pelos resultados por nós obtidos, podemos de uma forma geral dizer que o AA induziu uma diminuição da viabilidade celular acompanhada pelo aumento de morte em todas as linhas celulares, de forma dependente da concentração. Contudo, o tipo de morte celular induzido é dependente da linha celular em estudo. O AA diminuiu a viabilidade das células C2BBel induzindo a morte celular por apoptose quando em concentrações baixas ou por necrose quando em concentrações elevadas. A presença de células em apoptose tardia/necrose após tratamento com a concentração de 10 mM de AA corrobora a deteção do pico apoptótico aquando da análise do ciclo celular. Vários autores descreveram que a apoptose é induzida por um estímulo oxidativo moderado enquanto a necrose é consequência de um estímulo oxidativo mais intenso e que, por isso, o tipo de morte celular mediada por ROS depende da quantidade e do tipo de ROS produzidas (Valko *et al*, 2006; Ayyagari & Brard, 2014). Em relação aos nossos resultados, o aumento da concentração de AA poderá ter induzido um estímulo oxidativo mais intenso que levou à alteração dos mecanismos de morte observados nas

células C2BBel. De maneira interessante, nas células da linha LS1034, a diminuição da viabilidade celular foi acompanhada pelo aumento da morte celular por apoptose, de forma dependente da concentração de AA, mesmo após exposição a 20 mM. Este facto mostra-se em concordância com a presença evidente do pico apoptótico na análise do ciclo celular. A diferente resposta das células desta linha celular face ao tratamento com elevadas concentrações de AA poderá indicar que o seu mecanismo de ação subjacente não seja o mesmo. Relativamente à linha celular WiDr, observou-se que a diminuição da viabilidade celular está associada a um aumento da morte celular tanto por apoptose como por necrose. Estudos realizados por outros autores revelaram também que o ascorbato induz morte celular tanto por apoptose como por necrose, com prevalência de necrose para elevadas concentrações (Chen *et al*, 2005; Ranzato *et al*, 2011).

Estudámos os mecanismos de morte celular em maior detalhe através da análise da expressão de BAX e de BCL-2, da alteração do potencial de membrana mitocondrial, da expressão de caspase-8 e caspase-9, da genotoxicidade, do stresse oxidativo e da expressão de P53, de VEGF e de PGP. A análise e discussão destes parâmetros conduziu-nos a três mecanismos de ação da vitamina C que se encontram esquematizados no Anexo II extensível, na Figura 72, na Figura 73 e na Figura 74.

O processo apoptótico pode ser simplificado em três fases distintas: a iniciação ou o estímulo, a regulação e a execução. A fase de iniciação implica a ativação da via apoptótica, quer seja pela via intrínseca caracterizada pela disfunção mitocondrial, ou pela via extrínseca desencadeada a nível da membrana celular pela ligação e pela ativação de recetores de morte (Knowles & Selby, 2005; Sun & Peng, 2009). A fase reguladora envolve a decisão da célula se submeter ao compromisso irreversível com a morte celular. Nesta fase, a mitocôndria desempenha um papel fundamental na integração de sinais apoptóticos, assim como, na amplificação das vias de sinalização dos recetores de morte. A fase de execução representa a via final comum de morte celular e envolve clivagem, degradação nuclear e alterações da membrana celular mediadas por enzimas específicas, as caspases. A ativação desta fase é essencialmente irreversível e resulta em alterações bioquímicas intimamente relacionadas com alterações morfológicas (Knowles & Selby, 2005).

Um desequilíbrio entre a expressão das proteínas pró- e anti-apoptóticas pode impedir as células de responder corretamente a um estímulo apoptótico (Petros *et al*, 2004). A família BCL-2 desempenha um papel fundamental na regulação da apoptose, da necrose e da autofagia, de forma que alterações na sua expressão e função contribuem para a patogénese e para a progressão de inúmeros tipos de cancro (Reed, 2006, 2008). Esta família de proteínas reguladoras da morte celular inclui proteínas pró-apoptóticas, tais como, a BAX, a BAK (do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer protein*), a BAD (do inglês *Bcl-2-associated death promoter protein*) e a BID (do inglês *BH3 interacting-domain death agonist protein*), e proteínas anti-apoptóticas, tais como, a BCL-2 e a BCL-XL (do inglês *B-cell lymphoma-extra-large protein*). A sobre-expressão dos membros anti-apoptóticos desta família induz resistência a terapias anti-tumorais, visto que estes atuam como repressores da apoptose, bloqueando a libertação do citocromo C, enquanto os membros pró-apoptóticos atuam como promotores da apoptose. Estes efeitos podem ser quantificados através do balanço entre a expressão de BAX e de BCL-2 (Petros *et al*, 2004; Ghobrial *et al*, 2005; Gogvadze *et al*, 2008).

Numa primeira análise avaliámos os níveis basais de BAX e de BCL-2 nas células de cada linha celular. As células da linha C2BBel apresentaram níveis aumentados de BAX, enquanto as da linha celular LS1034 apresentaram níveis reduzidos de BCL-2. Dentro da mesma linha celular, apenas evidenciámos diferenças nas células da linha C2BBel, sendo a expressão basal de BAX mais de duas vezes superior à expressão de BCL-2.

Analisámos o efeito do ácido ascórbico na expressão de BAX e de BCL-2 através da razão BAX/BCL-2, cujo aumento dependente da concentração de AA foi observado nas células das linhas C2BBel e LS1034. Este aumento foi mais evidente nas células da linha LS1034 após exposição a 20 mM de AA que corresponde, aproximadamente, ao triplo da condição controlo, resultado que se mostrou concordante com o predomínio da apoptose nesta condição.

Durante a transdução de um sinal de toxicidade, uma via apoptótica comum de ativação das caspases envolve a permeabilização da membrana mitocondrial. O controlo da permeabilização da membrana mitocondrial é um evento crítico positivamente e

negativamente regulado por proteínas específicas no meio intracelular (Knowles & Selby, 2005; Lopez & Tait, 2015). Apesar de haverem muitos mecanismos moleculares que ainda não são inteiramente conhecidos, sabe-se que a sobre-expressão de BAX induz morte celular por apoptose, através de um processo que inclui a permeabilização das membranas mitocondriais, interna e externa. Tem sido descrito que a proteína BAX medeia a permeabilização da membrana mitocondrial interna, resultando na dissipação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). O potencial de energia associado com o  $\Delta\psi_m$  é utilizado pelo complexo V da cadeia respiratória para a síntese de ATP. O colapso do  $\Delta\psi_m$  resulta, assim, na cessação da síntese de ATP, na liberação do citocromo C e na consequente morte celular (Knowles & Selby, 2005). O  $\Delta\psi_m$  pode ser entendido como a diferença de cargas entre a matriz mitocondrial e o citoplasma, a qual tem implicações na indução da apoptose (Ly *et al*, 2003). O poro de permeabilidade transitória mitocondrial é regulado pelo  $\Delta\psi_m$  e pelo pH da matriz mitocondrial o qual, quando aberto, permite a liberação de fatores apoptogénicos (Ly *et al*, 2003; Leanza *et al*, 2014).

No nosso estudo, a resposta das células das três linhas celulares ao AA a nível do  $\Delta\psi_m$  foi semelhante, pois quanto maior a concentração de AA, menor o  $\Delta\psi_m$ . Estes dados indicam que a via intrínseca da apoptose estará implicada no mecanismo de ação mediado pelo AA. A consistência destes resultados é realçada pela concordância com os níveis de apoptose observados após a dupla marcação com AV e IP. Contudo, mesmo nos casos em que se observa a alteração de uma via de morte por apoptose para uma via de morte por necrose, em resposta a concentrações mais elevadas de AA, nomeadamente nas células das linhas celulares C2BBel e WiDr, o  $\Delta\psi_m$  poderá estar implicado. A apoptose é um processo regulado, geneticamente programado e dependente da disponibilidade de ATP e, conseqüentemente, da função mitocondrial. Uma disrupção abrupta do  $\Delta\psi_m$  pode, no entanto, causar a depleção do ATP a um nível que seja insuficiente para a sobrevivência da célula e para o término do processo apoptótico, culminando assim em morte celular por necrose (Ayyagari & Brard, 2014).

Outra das principais características bioquímicas da apoptose é a ativação de proteases intracelulares, as caspases, as quais estão presentes nas duas vias de ativação



da apoptose, a via intrínseca e a via extrínseca (Kruidering & Evan, 2000). As caspases são sintetizadas como pró-caspases as quais, perante um estímulo pró-apoptótico, se tornam em caspases ativas (Sun & Peng, 2009). Uma vez ativas, as caspases clivam centenas de proteínas e conduzem à rápida morte celular com marcas bioquímicas e morfológicas distintas (Lopez & Tait, 2015). A caspase-8, de 55 kDa, reside no citoplasma como precursor inativo. Uma vez ativada dá origem a dois polipéptidos, um longo (~20 kDa) e um curto (~12 kDa). Apesar de estar também implicada noutras vias de sinalização, a caspase-8 é imprescindível como caspase efetora da apoptose induzida pela via dos recetores de morte, ou seja, a via extrínseca ou membranar (Kruidering & Evan, 2000). Por outro lado, a caspase-9 está implicada na via intrínseca da apoptose. Como consequência da disfunção mitocondrial ocorre a libertação de fatores ativadores de caspases, incluindo o citocromo C. Uma vez no citosol, o citocromo C liga-se à molécula adaptadora APAF-1 (do inglês *apoptotic protease activating factor-1*), cujas extensas alterações conformacionais conduzem à sua oligomerização com formação da estrutura heptamérica denominada apoptossoma. O apoptossoma recruta e ativa a pró-caspase-9, a qual é clivada e, como consequência, ativa a caspase-3, responsável pela iniciação da cascata das caspases que culmina na apoptose (Sun & Peng, 2009; Yang *et al*, 2014; Lopez & Tait, 2015).

A ausência de alterações na expressão de caspase-8 após tratamento com ácido ascórbico indica que o processo apoptótico não se dá pela via extrínseca, pelo menos para as condições em que se observou marcação positiva para a anexina V. Este facto foi comum a todas as linhas celulares em estudo. Kang e seus coautores reportaram também o efeito citotóxico e pró-oxidante do ascorbato de sódio com diminuição do  $\Delta\Psi_m$ , libertação do citocromo C da mitocôndria e consequente indução de apoptose; contudo, de forma independente da caspase-8 (Kang *et al*, 2003).

Em contraste, as alterações observadas na expressão de caspase-9, após tratamento com ácido ascórbico, sugerem que a via intrínseca da apoptose estará implicada no mecanismo de ação do AA, corroborando os resultados anteriormente descritos. Contudo, a resposta celular foi dependente da concentração de AA e da linha celular.

Nas células da linha celular C2BBel observou-se a diminuição da pró-caspase-9, proteína com 46 kDa de peso molecular, acompanhada pelo aumento do produto de clivagem com 35 kDa de peso molecular, o qual constitui a subunidade catalítica. Desta forma, denota-se a ativação da caspase-9.

Nas células da linha celular LS1034 observou-se apenas uma alteração significativa consequente do tratamento com 10 mM de ácido ascórbico, o qual induziu uma diminuição estatisticamente significativa da subunidade catalítica da caspase-9. A resistência das células tumorais à apoptose mitocondrial é um fenómeno frequente. Geralmente, a permeabilização da membrana externa mitocondrial é considerada um ponto sem retorno para a célula. Contudo, em determinadas circunstâncias, as células tumorais apresentam mecanismos de resistência que lhes permitem sobreviver a esta disfunção mitocondrial, mecanismos esses que poderão passar pela inibição das caspases (Lopez & Tait, 2015). Por outro lado, um mecanismo de indução de apoptose, independente de caspases, pode também estar a ser ativado pelo AA nesta linha celular. Apoptose intrínseca independente de caspases é a terminologia atribuída pela entidade *Nomenclature Committee on Cell Death* para descrever um tipo de morte celular com características morfológicas de apoptose como, por exemplo, a condensação da cromatina nuclear, contudo, sem intervenção de caspases (Galluzzi *et al*, 2012). Este tipo de morte celular programada é controlado pela mitocôndria, sendo o seu principal efetor a proteína mitocondrial indutora de apoptose AIF (do inglês *apoptosis-inducing factor*) (Nikolietopoulou *et al*, 2013). A AIF é uma proteína conhecida pela sua atividade redox a nível da mitocôndria e pela sua função pró-apoptótica no núcleo. A sua libertação da mitocôndria é mediada por proteínas pró-apoptóticas, como a proteína BAX, através da formação do poro de permeabilidade transitória mitocondrial, resultado da diminuição do  $\Delta\psi_m$  (Delavallée *et al*, 2011). Uma vez no citoplasma, a proteína AIF é translocada para o núcleo onde desencadeia a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA (Hong *et al*, 2007). Estudos realizados em linhas celulares de cancro da mama humano demonstraram também que o ascorbato ativa uma via de morte celular independente de caspases e dependente da proteína AIF (Hong *et al*, 2007).

A nível das células WiDr, o ácido ascórbico induziu uma diminuição da pró-caspase-9, mas também da sua subunidade ativa. De salientar que o tratamento com 10 mM de AA induziu essencialmente morte por necrose das células WiDr, condição essa na qual a inibição da caspase-9 e do seu produto de clivagem é estatisticamente significativa, sugerindo uma correlação entre ambos os factos. No final dos anos 80 tornou-se claro que a necrose pode funcionar como um tipo de morte celular programada, desencadeada pelos mesmos sinais de morte responsáveis pela indução de apoptose (Laster *et al*, 1988; Nikolettópoulou *et al*, 2013). O papel da mitocôndria na necrose mediada pela presença de stresse oxidativo foi recentemente demonstrado, com ênfase na permeabilidade transitória mitocondrial. Esta é responsável pela disfunção mitocondrial, diminuição da produção de energia e eventual morte celular por necrose (Choi *et al*, 2009). A depleção de ATP pode, assim, favorecer a alteração do mecanismo de morte, que passa da apoptose para a necrose, tendo em conta que a ativação de caspases requer a existência de ATP, como mencionado. Está igualmente descrito que a inibição das caspases pode sensibilizar a célula à morte por necrose (Golstein & Kroemer, 2007). Vários estudos realizados em linhas celulares tumorais mostram que um estímulo oxidativo intenso, induzido pela presença de concentrações farmacológicas de ascorbato, é capaz de diminuir os níveis de ATP, associado à diminuição da proliferação celular, ao bloqueio do ciclo celular e à morte celular (Ma *et al*, 2014; Fukui *et al*, 2015). Desta forma, nas células da linha celular WiDr o ácido ascórbico, presente em concentrações farmacológicas, funciona como promotor da disfunção mitocondrial que, por sua vez, poderá causar a depleção de ATP. Esta será responsável pela evidente inibição da caspase-9 observada no nosso estudo, que poderá sensibilizar a célula à morte por necrose.

Vários autores têm descrito a associação entre o efeito citotóxico do ácido ascórbico e um efeito genotóxico, na medida em que concentrações farmacológicas de AA induzem lesões a nível do DNA, essencialmente decorrentes do aumento do stresse oxidativo (Herst *et al*, 2012; Dixon & Stockwell, 2014; Ma *et al*, 2014; Du *et al*, 2015b). Para além disso, Du e seus coautores (Du *et al*, 2015b) averiguaram o papel desempenhado pelos metais ativos, tanto a nível intracelular como extracelular, na citotoxicidade induzida pelo AA. Neste contexto, os autores aferiram que as células

tumorais são capazes de reparar as lesões do DNA após o consumo do peróxido de hidrogénio. Contudo, a presença de iões ferro e a consequente oxidação do AA produzem um fluxo contínuo de  $H_2O_2$ , que poderá comprometer a capacidade de reparação das lesões do DNA pelas células, induzindo lesões duradouras que poderão conduzir à morte celular (Du *et al*, 2015b).

Embora por mecanismos distintos, nas células de cada uma das linhas celulares por nós estudadas, constatou-se que o ácido ascórbico induziu morte celular e lesões no DNA de forma dependente da concentração, nas três linhas celulares. O ensaio cometa é uma técnica que permite obter informações relativamente às lesões induzidas em cadeias simples do DNA (Olive & Banáth, 2006). Esta técnica permitiu apurar que o efeito citotóxico do AA está relacionado com a lesão da molécula de DNA, de modo que quanto maior a concentração de AA, maior a extensão das lesões no DNA (aferida pelo parâmetro percentagem de DNA na cauda do cometa) e maior a quantidade de lesões do DNA (aferida pelo parâmetro comprimento da cauda do cometa). Não obstante os diferentes mecanismos de morte celular mediados pelo AA nas três linhas celulares em estudo, verificou-se a presença de lesões no DNA em todas elas. Nas células da linha celular C2BBel, 1 mM de AA foi suficiente para causar um aumento estatisticamente significativo das lesões no DNA. Vários autores reportaram o efeito genotóxico induzido pelo AA em células de linhas celulares de cancro colorretal (Kontek *et al*, 2013), de leucemia (Rivière *et al*, 2006; Shinozaki *et al*, 2011), de cancro pancreático (Du *et al*, 2010) e de glioblastoma (Herst *et al*, 2012).

O principal mecanismo de ação atualmente proposto para o efeito citotóxico do ácido ascórbico reside no facto deste atuar como um pró-fármaco na entrega de peróxido de hidrogénio aos tumores (Chen *et al*, 2005, 2007; Du *et al*, 2015b). A oxidação do AA, com formação do radical ascorbil ( $Asc^{\cdot}$ ), e a consequente cedência de eletrões, medeiam a produção de peróxido de hidrogénio a nível extracelular o qual, uma vez difundido para o meio intracelular, induz lesões oxidativas em macromoléculas, como proteínas, lípidos e DNA (Kontek *et al*, 2013; Dixon & Stockwell, 2014; Du *et al*, 2015b). No presente estudo, verificou-se igualmente que o AA contribui para o aumento do stresse oxidativo nas células das linhas celulares C2BBel e WiDr, contudo, o mesmo

não se verificou nas células LSI034. Nestas não se verificaram alterações dependentes da concentração de AA a nível da produção intracelular de radical superóxido, de peróxidos, de GSH e da atividade da enzima SOD, razão pela qual o mecanismo proposto para esta linha celular será discutido posteriormente.

Fisiologicamente, as principais ROS incluem o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Por sua vez, as principais espécies RNS incluem o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), o dióxido de nitrogénio ( $NO_2^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ). As concentrações fisiológicas destas espécies radicalares são mantidas numa gama estreita, graças ao balanço existente entre a taxa de produção e a taxa de remoção, por antioxidantes enzimáticos, como a SOD, a GPx e a catalase, ou antioxidantes não enzimáticos, como a GSH (Koskenkorva-Frank *et al*, 2013).

O radical superóxido, formado como um subproduto da cadeia respiratória mitocondrial e em reações controladas, é catalisado pelas oxidases NADPH ou pela xantina oxidase. Em sistemas biológicos, as principais reações deste radical são consigo mesmo, por dismutação espontânea, ou com outros radicais biológicos, como o óxido nítrico, resultando na formação da molécula tóxica peroxinitrito. O radical superóxido pode, também, inativar enzimas contendo *clusters* ferro-enxofre, libertando um eletrão que participará na reação de *Fenton* com formação do radical hidroxilo. Para além disso, inicia a peroxidação lipídica dos ácidos gordos polinsaturados. Devido à sua reduzida reatividade, o radical superóxido difunde-se facilmente desde o seu local de produção, desencadeando stresse oxidativo em toda a célula (Manda *et al*, 2009).

A análise de fluorescência com a sonda DHE permitiu quantificar a produção intracelular de radical superóxido após exposição das células tumorais ao ácido ascórbico. Assim, verificou-se que o AA induziu um aumento estatisticamente significativo da produção intracelular desta ROS, de forma dependente da concentração de AA, nas células das linhas celulares C2BBel e WiDr. O mecanismo de ação do AA proposto por *Chen* e seus coautores corrobora os resultados por nós obtidos com as duas linhas celulares referidas. Segundo este mecanismo o AA, presente em concentrações farmacológicas, perde um eletrão, formando-se o radical ascorbil. O eletrão disponibilizado na oxidação do AA participa na redução do ião metálico presente

numa metaloproteína, disponibilizando outro eletrão que irá interagir com o oxigénio molecular e levar à formação de radical superóxido (Chen *et al*, 2007). Desta forma, quanto maior a concentração de AA, maior a produção de radical superóxido. Contudo, Chen e coautores demonstraram que esta sequência de reações se dá a nível extracelular. O aumento da produção intracelular de radical superóxido sugere que a totalidade ou parte destas reações poderão ocorrer igualmente a nível intracelular.

O radical superóxido pode também ser dismutado em peróxido de hidrogénio por catálise enzimática mediada pela SOD. Como potente antioxidante, a SOD destoxifica a primeira ROS produzida durante um estímulo oxidativo. No entanto, estando o sistema antioxidante da célula tumoral diminuído, pela reduzida presença de catalase e de GPx (Drisko *et al*, 2003; Gilloteaux *et al*, 2014), a decomposição do peróxido de hidrogénio, formado na presença de ferro, poderá levar ao aumento do stress oxidativo pela formação de espécies ainda mais reativas, como é o caso do radical hidroxilo (Manda *et al*, 2009; McCarty & Contreras, 2014). Ranzato e coautores descreveram recentemente um novo mecanismo de atuação seletiva do ascorbato em células tumorais, com elevada relevância para o papel desempenhado pelo radical superóxido a nível intracelular. Estes autores demonstraram que a taxa de produção do radical superóxido é superior nas células tumorais de mesotelioma em comparação com as células normais. Desta forma, postularam que a reação de *Haber-Weiss* é o mediador chave do impacto letal de concentrações farmacológicas de ascorbato nas células tumorais. De facto, o peróxido de hidrogénio produzido a nível extracelular irá interagir com o radical superóxido produzido em grande escala pelas células tumorais, induzindo à formação de radicais hidroxilo altamente reativos e, conseqüentemente, citotóxicos (Ranzato *et al*, 2011; McCarty & Contreras, 2014).

Posteriormente avaliámos a produção intracelular de peróxidos verificando-se, nas células da linha celular C2BBel, uma diminuição da mesma com o aumento da concentração de ácido ascórbico. Contrariamente, na linha celular WiDr não se verificaram alterações estatisticamente significativas na produção intracelular de peróxidos. De modo a entender o papel desempenhado pelas ROS e pelas defesas antioxidantes no efeito citotóxico mediado pelo AA, medimos os níveis de GSH e da

atividade de SOD. Adicionalmente, avaliámos a influência de inibidores de stresse oxidativo (catálase e manitol), com o intuito de perceber a implicação do peróxido de hidrogénio e do radical hidroxilo no efeito anti-proliferativo do ácido ascórbico.

Como referido anteriormente, o radical superóxido é dismutado em peróxido de hidrogénio pela SOD e este é decomposto pela enzima catálase, a qual previne a sua acumulação (Valko *et al*, 2007). O peróxido de hidrogénio pode também ser neutralizado pela GSH, fator chave no sistema de defesa antioxidante, que contribui para a manutenção da integridade celular perante ROS endógenas ou exógenas. ROS e RNS podem induzir a oxidação da GSH celular ou o seu efluxo para o meio extracelular, levando à perda da homeostase redox intracelular e à ativação das cascatas de sinalização da apoptose (Circu & Aw, 2012). O peróxido de hidrogénio é o peróxido mais eficientemente eliminado pela enzima GPx, que requer a GSH como doador de eletrões, a qual é oxidada a GSSH (Hedley & Chow, 1994). Por último, o manitol foi utilizado como neutralizador do radical hidroxilo (Maramag *et al*, 1997; Ding *et al*, 2004), uma ROS extremamente reativa, capaz de provocar lesões na maioria dos componentes celulares, nomeadamente, nos hidratos de carbono, nos ácidos nucleicos, nos lípidos e nas proteínas (Manda *et al*, 2009).

No nosso trabalho verificámos que concentrações crescentes de ácido ascórbico induziram a diminuição estatisticamente significativa dos níveis de GSH nas células das linhas celulares C2BBel e WiDr. Paralelamente, verificámos-se o aumento, para o triplo, da atividade da enzima SOD quando as mesmas células foram tratadas com 10 mM de AA, em comparação com o controlo. Quando as células foram tratadas com catálase, para avaliação da implicação do peróxido de hidrogénio no efeito anti-proliferativo do AA, verificou-se que a catálase inibiu o efeito citotóxico do AA, que se traduziu no aumento do valor do seu IC<sub>50</sub>. Este dado prova a implicação do peróxido de hidrogénio na citotoxicidade mediada pelo AA nas células das três linhas celulares. Por outro lado, a incubação com manitol mostrou resultados dependentes da linha celular, não se verificando alterações nos valores de IC<sub>50</sub> do AA nas células C2BBel na presença de manitol. Nas células LS1034 e WiDr, a presença de manitol induziu um aumento dos respetivos valores de IC<sub>50</sub> do AA, sugerindo que o radical hidroxilo está envolvido no

mecanismo de ação do AA. Por último, avaliou-se também a sensibilidade das células das três linhas celulares ao peróxido de hidrogénio, verificando-se que as três são sensíveis ao mesmo, com valores de  $IC_{50}$  muito semelhantes e que variam entre 260 e 300  $\mu M$ . A análise destes dados permitiu inferir que, não obstante ao efeito anti-proliferativo, citotóxico e genotóxico do AA, comum às três linhas celulares, é evidente que o mecanismo de citotoxicidade difere entre elas.

Os dados obtidos para a linha celular C2BBel sugerem que o AA poderá induzir o aumento de stresse oxidativo pela sua ação a nível intra ou extracelular. Uma vez oxidado, o ácido ascórbico disponibiliza eletrões que serão necessários à formação de radical superóxido e de peróxido de hidrogénio. De realçar que o radical superóxido não é capaz de atravessar a membrana celular (McCarty & Contreras, 2014). Em contraste, o peróxido de hidrogénio, devido à sua lipofilicidade, estrutura semelhante à da molécula de água e reduzida reatividade inata, difunde-se livremente entre os meios intra e extracelular e pelos tecidos, interferindo com alvos celulares à distância do seu local de produção (Manda *et al*, 2009). Assim, o AA poderá atravessar a membrana celular e mediar a produção de radical superóxido, efeito amplificado pela disfunção mitocondrial, igualmente observada nesta condição, o que justifica o aumento significativo desta ROS. As lesões mitocondriais predizem uma menor eficiência a nível da cadeia transportadora de eletrões e, conseqüentemente, um aumento da disponibilidade de eletrões que resulta no aumento da formação de radical superóxido (Manda *et al*, 2009).

Paralelamente na linha celular C2BBel, o aumento da atividade da enzima SOD implica a produção de peróxido de hidrogénio a partir do radical superóxido. Contudo, parte do peróxido de hidrogénio formado é destoxificado pela GSH, justificando o seu consumo. A redução de cada molécula de peróxido de hidrogénio envolve o consumo de duas moléculas de GSH (Valko *et al*, 2006), pelo que seria de esperar que a diminuição de GSH fosse mais acentuada que a diminuição de peróxidos; no entanto, verifica-se que a diminuição de peróxidos é mais acentuada. Este facto poderá traduzir o envolvimento de outras espécies reativas, como o radical óxido nítrico, peroxinitrito e hipoclorido, RNS que também reagem com a sonda DCF utilizada para medir a produção intracelular



de peróxidos (Rhee *et al*, 2010). O peroxinitrito forma-se a partir da reação entre o radical óxido nítrico e o radical superóxido, constituindo assim uma espécie secundária com maior poder oxidante (Weidinger & Kozlov, 2015), capaz de desencadear respostas celulares como lesões membranares, fragmentação do DNA, peroxidação lipídica, libertação do citocromo C e, conseqüentemente, apoptose e necrose (Turrens, 2003; Orrenius *et al*, 2007; Hrabarova *et al*, 2011). Alguns destes eventos celulares foram observados nas células da linha C2BBel, enfatizando esta hipótese. Para além disso, os resultados obtidos com a catalase, implicam o envolvimento do peróxido de hidrogénio mas também do peroxinitrito, tendo em conta que a catalase é responsável pela destoxificação de ambas as espécies (Bauer, 2015; Riethmüller *et al*, 2015). Assim, depreende-se que o radical superóxido e o peroxinitrito formado a partir deste, poderão ser as principais espécies reativas envolvidas no mecanismo de citotoxicidade do AA na linha celular C2BBel.

Nas células da linha celular WiDr, os resultados por nós obtidos propõem que o mecanismo de ação do ácido ascórbico segue o modelo proposto por Chen *et al*. (2007), de acordo com o qual o AA atua como um pró-fármaco, induzindo o aumento de stresse oxidativo que culmina em morte celular. Desta forma, o AA é oxidado com formação do radical ascorbil e libertação de eletrões. A doação de eletrões mediada posteriormente por um ião metálico leva à formação do radical superóxido, o qual é, por sua vez, convertido em peróxido de hidrogénio (Chen *et al*, 2007; Du *et al*, 2012; Wilson *et al*, 2014). O aumento do radical superóxido associado ao aumento da atividade da SOD e à diminuição da GSH, todos eles dependentes do aumento da concentração de AA, são um indicativo do aumento do stresse oxidativo e corroboram o mecanismo supracitado. Quer as reações anteriores se processem no meio intracelular ou no meio extracelular, o peróxido de hidrogénio formado pode induzir lesões celulares ou, em alternativa, ser convertido em espécies ainda mais reativas. Sabe-se que uma das principais interações do peróxido de hidrogénio incluem a sua participação na reação de Fenton, com produção do radical hidroxilo (Manda *et al*, 2009; Weidinger & Kozlov, 2015). Esta constitui uma ROS extremamente citotóxica, cuja implicação no mecanismo de ação do AA é comprovada pelos nossos resultados obtidos com o manitol. A inibição do radical hidroxilo pelo manitol anulou o efeito anti-proliferativo do AA, refletido no

aumento do respetivo valor de  $IC_{50}$ . Estes factos sugerem que, na linha celular WiDr, a citotoxicidade do AA deve ser mediada pelo radical hidroxilo, após conversão do peróxido de hidrogénio. Os estudos das vias de morte anteriormente descritas para esta linha celular indicaram que o AA induziu disfunção mitocondrial, relacionada com a depleção de ATP, conducente à morte celular por necrose. Vários autores referem que um dos mecanismos de citotoxicidade do AA, quando presente em concentrações farmacológicas, inclui a depleção de ATP induzida pelo aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio (Chen *et al*, 2012b, 2015a; Wilson *et al*, 2014). A interação do peróxido de hidrogénio com os iões ferro origina a formação do radical hidroxilo, responsável por lesões extensas a nível do DNA (Du *et al*, 2015a), também observadas nas células WiDr após exposição a 5 mM de ácido ascórbico. De realçar ainda que um estímulo oxidativo mais intenso, passível de ser mediado pelo radical hidroxilo, está associado a um tipo de morte celular por necrose (Ayyagari & Brard, 2014), maioritariamente observado na linha celular WiDr após tratamento com elevadas concentrações de AA.

Relativamente às células LSI034, estas revelaram ser as mais resistentes ao ácido ascórbico. Este facto poderá estar relacionado com a sua resistência ao stresse oxidativo, tendo em consideração que o AA não afetou o ambiente redox intracelular desta linha celular. O tratamento com AA não induziu alterações na produção do radical superóxido nem de peróxidos, na expressão de GSH e na atividade da enzima SOD. Em contraste, os estudos com os inibidores de stresse oxidativo mostraram que, tanto a catalase como o manitol, inibiram o efeito anti-proliferativo do AA, implicando o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo no seu mecanismo de ação. No entanto, uma análise cuidada da curva de dose-resposta representada na Figura 37, evidencia que este efeito inibitório é anulado para concentrações de AA mais elevadas. Desta forma, propõe-se que, na presença de maiores concentrações de AA, as células LSI034 desenvolvem um mecanismo de resistência ao stresse oxidativo mediado pelo AA. Barrera (Barrera, 2012) e Landriscina e seus coautores (Landriscina *et al*, 2009) descreveram que alguns tipos de células não são diretamente afetados pelo aumento do stresse oxidativo, devido à sua capacidade de se adaptarem às alterações do ambiente redox. Assim, postula-se que as células da linha LSI034 possam desenvolver essa resposta adaptativa que lhe permite sobreviver e, de alguma forma, anular quaisquer

espécies oxidativas formadas. Esta resposta adaptativa poderá também estar na origem da sua conhecida resistência à quimioterapia e à radioterapia (Casalta-Lopes *et al*, 2011; Barrera, 2012). Apesar desta resistência adquirida, os resultados discutidos anteriormente mostraram que a exposição das células LSI034 a 20 mM de ácido ascórbico durante 24 horas inibiu a sua proliferação celular para cerca de 40%, diminuiu a viabilidade celular em cerca de 30% e induziu também um efeito genotóxico estatisticamente significativo. Portanto, tendo em conta que para concentrações de AA elevadas, o seu mecanismo de ação não é mediado por ROS, outras vias poderão estar envolvidas. Alguns autores propuseram que o AA poderá atuar via um mecanismo de ação a nível intracelular, não dependente de ROS, mas dependente da ativação do HIF-1 $\alpha$  (Vissers *et al*, 2007; McCarty, 2013; Wilson *et al*, 2014). Estas hipóteses levaram à avaliação da expressão de P53, de VEGF-R1 e PGP, possivelmente intervenientes no efeito citotóxico do AA.

Tendo em conta que as células das três linhas celulares em estudo possuem diferentes perfis genéticos, nomeadamente, no que diz respeito à expressão de P53, foi deveras importante avaliar até que ponto a presença de ácido ascórbico interfere na expressão desta proteína “reguladora do genoma”. Num estudo realizado por *Jinsum Kim et al.*, os autores aferiram que a citotoxicidade do AA está positivamente relacionada com a expressão de P53, na medida em que uma rede transcripcional regulada por esta proteína participa no aumento da produção de ROS associadas ao efeito citotóxico do AA (Kim *et al*, 2012).

Os nossos resultados revelaram que as células da linha celular C2BBel não expressam a proteína P53, tanto na condição controlo como após exposição a concentrações milimolares de AA. Este facto, aliado à elevada sensibilidade desta linha celular ao AA, prova que o ácido ascórbico pode induzir morte celular por uma via independente da P53. Sabe-se também que, de uma forma geral, lesões no DNA ou outro tipo de stresse celular aumentam os níveis da proteína P53, a qual induz a transcrição da proteína P21, responsável pelo bloqueio do ciclo celular na fase G1 (Wang *et al*, 2015b). Assim, uma vez que a ativação da via P53/P21 é crucial para o *checkpoint* G1 (Benada & Macurek, 2015), a ausência de P53 pode fazer com que as células C2BBel

prossigam o ciclo celular sem reparação de possíveis lesões induzidas pelo AA, verificando-se o bloqueio do ciclo celular apenas no *checkpoint* seguinte, isto é, na fase S.

Nas células da linha LS1034, a presença de concentrações farmacológicas crescentes de AA não induziu alterações na expressão de P53. À semelhança do observado nas células C2BBel, o mecanismo de ação do AA pode ser independente da P53. Estudos genéticos conduziram à formulação da hipótese de que tumores com mutações na proteína P53, níveis elevados de BCL-2 ou razão BCL-2/BAX elevada terão maior propensão para apresentar características de resistência aos tratamentos (Brown & Wouters, 1999). Sabe-se ainda que doentes com cancro colorretal com o gene *TP53* mutado são frequentemente resistentes às terapias convencionais, conferindo um prognóstico menos favorável (Li *et al*, 2015). Embora a maioria das mutações da proteína P53 resultem na sua inativação ou disfunção, algumas mutações estão descritas como levando à perda seletiva de funções apoptóticas, mesmo que mantenham a capacidade de induzir o bloqueio do ciclo celular. Outras mutações da proteína P53 poderão torná-la um oncogene, através de mecanismos de ganho de função (Wang *et al*, 2015b). Segundo a ATCC, este é o caso da linha celular LS1034, cuja mutação no gene *TP53* lhe confere propriedades oncogénicas e faz com que regule fracamente a proteína P21 (American Type Culture Collection, 2015). Como referido anteriormente, o bloqueio do ciclo celular promovido pela P53 requer a transcrição da proteína P21, a qual regula o bloqueio do ciclo celular na fase G1 (Wang *et al*, 2015b). Desta forma, conclui-se que a lesão induzida pela exposição da linha celular LS1034 ao AA não é reconhecido pela proteína P53, na medida em que, não só a sua expressão não é alterada, como também o bloqueio do ciclo celular se dá apenas na fase S. De realçar que, não obstante as características de quimiorresistência descritas para esta linha celular (Casalta-Lopes *et al*, 2011), o seu prognóstico menos favorável conferido pela mutação no gene *TP53* e a sua capacidade de se adaptar ao aumento do stresse oxidativo, a terapia com AA mostrou ser eficaz na indução de morte celular por apoptose, por um mecanismo independente de ROS e da expressão de P53. Estes dados sustentam o potencial clínico do uso de concentrações farmacológicas de vitamina C como parte da abordagem terapêutica para o cancro colorretal resistente ao stresse oxidativo.

Por outro lado, os dados obtidos nas células da linha WiDr mostraram que a P53 pode estar implicada no mecanismo de ação do ácido ascórbico, uma vez que se verificou um aumento da expressão desta proteína com concentrações crescentes de AA. Os resultados anteriormente discutidos para esta linha celular mostraram que concentrações elevadas de AA induziram morte celular por necrose, como resposta a um estímulo oxidativo intenso que conduziu à disfunção mitocondrial e energética, com depleção de ATP que culminou em lesões irreparáveis no DNA. O papel central da P53 como sensor a múltiplos estímulos de stresse, conducentes à morte celular por apoptose ou por autofagia, foi já amplamente descrita (Brown & Wouters, 1999; Sui *et al*, 2011; Wang *et al*, 2015b). Contudo, estudos recentes apontam também para um novo papel desta proteína como moduladora da necrose (Nikoletopoulou *et al*, 2013). Como resposta ao stresse oxidativo, a P53 acumula-se na matriz mitocondrial e desencadeia a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial e, posteriormente, o processo necrótico por interação física com a ciclopilina D (CypD, do inglês *cyclophilin D*) (Vaseva *et al*, 2012). Apesar deste estudo ter sido realizado no âmbito de lesões cerebrais, o principal estímulo estudado foi a indução de stresse oxidativo, denominador comum verificado nas células WiDr após exposição ao AA. Assim, depreende-se que esta poderá constituir uma via de intervenção da P53 no mecanismo de citotoxicidade mediado pelo AA, que nesta linha celular culminou em morte celular por necrose.

Outro mecanismo de ação do ácido ascórbico, recentemente descrito, diz respeito à sua ação a nível intracelular pela inibição da ativação do HIF-1 $\alpha$  (Du *et al*, 2012; Wilson *et al*, 2014). Kawada e seus coautores demonstraram que elevadas concentrações de AA reduzem o crescimento das células de leucemia humana, pela inibição da transcrição do HIF-1 $\alpha$  e conseqüente diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, reguladas pela via do HIF-1 $\alpha$ , tais como a MCL-1 (do inglês, *myeloid cell leukemia 1*), a BCL-XL e a BCL-2 (Kawada *et al*, 2013). Para além disso, um estudo observacional retrospectivo, usando amostras de tecido normal e de tecido tumoral de 49 doentes com cancro colorretal, mostrou que a maior concentração de AA nas amostras tumorais estava associada a uma diminuição da ativação do HIF-1 $\alpha$  (Kuiper *et al*, 2014). Por outro lado, sabendo que o VEGF é produzido após ativação

desta via (Olsson *et al*, 2006; Vissers *et al*, 2007), é de esperar que o AA possa também desempenhar um papel importante na angiogénese tumoral pela modulação da expressão de VEGF. De facto, o papel anti-angiogénico do AA em modelos *in vitro* e *in vivo* foi já demonstrado por diferentes autores (Mikirova *et al*, 2008, 2010).

A hipótese sobre a influência do ácido ascórbico na expressão do recetor I do VEGF não foi confirmada nas células das três linhas celulares em estudo, na medida em que o tratamento com AA não induziu alterações na expressão deste recetor de forma dependente da concentração. Assim, conclui-se que o papel anti-angiogénico do AA, descrito por alguns autores, depende do tipo de cancro e das linhas celulares.

Segundo Casalta-Lopes e seus coautores, a quimiorresistência da linha celular LSI034 deve-se, em parte, à elevada expressão da proteína de efluxo PGP, uma glicoproteína de 170 kDa que transporta vários substratos contra o seu gradiente de concentração (Casalta-Lopes *et al*, 2011). Resultados apresentados anteriormente permitiram inferir que esta é a linha celular mais resistente ao efeito citotóxico do ácido ascórbico. Assim, avaliámos a expressão desta proteína na presença de concentrações crescentes de AA com o intuito de perceber se influencia a resistência ao AA. Porém, os dados obtidos mostraram que nenhuma das concentrações de AA testadas induziu alterações na expressão de PGP, presumindo-se assim não haver qualquer correlação entre a menor sensibilidade da linha celular LSI034 e um possível mecanismo de extrusão de AA associado à PGP.

## **Estudos de farmacocinética**

A farmacocinética do ácido ascórbico é um tópico deveras importante quando se pretende estudar o seu efeito e potencial mecanismo de ação a nível da célula tumoral. Apesar da maioria dos mamíferos ser capaz de sintetizar a vitamina C a partir da D-glicose no fígado, o ser humano não possui a enzima L-gulonolactona oxidase que permite a sua biossíntese, estando assim dependente da dieta para a sua obtenção (Lutsenko *et al*, 2004; Corti *et al*, 2010; Zanoni *et al*, 2013). Contudo,

independentemente da sua biodisponibilidade, todas as células animais estão estritamente dependentes de transportadores de vitamina C funcionais, que determinam a sua distribuição entre os meios intra e extracelular (Savini *et al*, 2008; Chen *et al*, 2012a). Tal como referido anteriormente, a vitamina C pode ser transportada para o interior da célula na sua forma oxidada (DHA) pelos GLUTs (nomeadamente GLUT-1 e GLUT-3) e na sua forma reduzida (AA) pelos SVCT-1 e SVCT-2 (Lutsenko *et al*, 2004; Savini *et al*, 2008).

Primeiramente foi avaliada a expressão membranar basal dos transportadores supracitados, isto é, na ausência de AA. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que as células das três linhas celulares expressavam os quatro tipos de transportadores analisados. Verifica-se também uma maior expressão basal de GLUT-1 relativamente ao GLUT-3 nas três linhas celulares. Apenas as células LSI034 apresentam diferenças significativas entre a expressão basal de SVCTs, com maior expressão de SVCT-1 relativamente ao SVCT-2. De uma forma geral, vários autores reportaram a existência de GLUT-1 (Huang *et al*, 2013; Li *et al*, 2014; Chen *et al*, 2015b) e de GLUT-3 (Chung *et al*, 1999; Maulén *et al*, 2003; Huang *et al*, 2013) em linhas celulares de cancro colorretal. Contudo, existe apenas um estudo realizado numa linha celular de adenocarcinoma colorretal com referência à expressão de SVCT-1 e de SVCT-2 (Maulén *et al*, 2003). Tendo em conta a escassa literatura relativamente à expressão de SVCTs em linhas celulares de cancro colorretal e com o intuito de conferir maior robustez aos nossos dados, a expressão de SVCTs foi também avaliada por *western blot*.

Os estudos de citometria e de *western blot* mostraram que, na presença de ácido ascórbico, as células apresentam alterações na expressão dos transportadores, contudo, as alterações são dependentes da concentração de AA, da linha celular e do tipo de transportador. Possíveis diferenças observadas entre as duas técnicas usadas para a análise da expressão de SVCTs, a citometria de fluxo e o *western blot*, devem-se às diferenças dos parâmetros analisados. Realça-se o facto da maior concentração testada em ambas as técnicas ter sido diferente, por questões experimentais anteriormente explicadas na secção dos Materiais e métodos, e o facto de no *western blot* se ter analisado a expressão de proteína total, enquanto na citometria de fluxo se analisou

apenas a expressão membranar. É importante também referir que a ausência de dados relativos ao tratamento com 5 mM de ácido ascórbico, aquando do estudo da expressão de SVCT-1 nas células da linha celular C2BBel por *western blot*, se deveu a limitações experimentais por insuficiente quantidade de proteína. Paralelamente à análise dos transportadores, a percentagem de captação de AA pelas células das linhas celulares foi estimada por correlação com a percentagem de captação do complexo radiomarcado  $^{99m}\text{Tc-AA}$ . A obtenção de um complexo radiomarcado com eficiência de marcação acima dos 90% e estável até aos 180 minutos viabilizou a sua utilização para averiguar o influxo de AA.

Nas células da linha C2BBel verificou-se que o tratamento com 10 mM de ácido ascórbico induziu o aumento estatisticamente significativo da expressão de GLUT-1, de SVCT-1 e de SVCT-2. Por outro lado, os estudos de captação evidenciaram uma captação máxima de  $0,34 \pm 0,04\%$  aos 90 minutos, tempo em que se verificaram diferenças estatisticamente significativas com o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Um aspeto curioso destes resultados é que, apesar da percentagem de captação máxima ser bastante reduzida, a expressão de transportadores aumentou, comparativamente com a condição controlo, quando adicionámos AA, em especial com a concentração de 10 mM. Maulén e coautores mostraram que as células CaCo-2 expressam os transportadores SVCT-1 e SVCT-2 funcionais, de modo a serem capazes de captar ácido ascórbico (Maulén *et al*, 2003). Considerando que as células C2BBel são um clone das células CaCo-2 (Straub *et al*, 2013), espera-se que os transportadores SVCT-1 e SVCT-2 sejam igualmente capazes de transportar diretamente o AA, aumentando a sua concentração intracelular. É de realçar que os estudos de captação foram realizados durante 2 horas, enquanto a expressão dos transportadores foi analisada após 24 horas de exposição ao AA. Esta diferença de tempo poderá justificar o reduzido influxo de AA durante as duas horas de avaliação. Tendo em conta que, após exposição a 10 mM de AA, o aumento dos SVCTs foi mais evidente em detrimento do GLUT-1, esta hipótese é enfatizada pelo facto do DHA ser rapidamente transportado para o interior da célula pelos transportadores de glicose em questão de minutos, enquanto o ascorbato leva horas a ser transportado visto que requer a presença de transportadores dependentes de sódio (May *et al*, 2003). O aumento da expressão de GLUT-1 indica também que a concentração intracelular de



AA poderá aumentar por um mecanismo de transporte indireto. No meio extracelular, o AA é oxidado com formação de DHA, o qual é transportado via GLUT-1 para o interior da célula, onde é rapidamente reduzido formando novamente AA (Corti *et al*, 2010; Wilson *et al*, 2014). Assim, postula-se que a maior sensibilidade da linha celular C2BBel ao AA possa dever-se às lesões causadas pela presença de AA tanto no meio extracelular como no meio intracelular.

Em suma, tal como ilustrado na Figura 47, os resultados obtidos nas células da linha C2BBel indicam que o AA induziu citotoxicidade através de um mecanismo dependente de ROS, com ativação da via intrínseca da apoptose e do processo necrótico para as concentrações mais elevadas de AA. O ácido ascórbico poderá atuar a nível extracelular mediando a produção de peróxido de hidrogénio o qual é, em parte, detoxificado pela GSH a nível intracelular. Por outro lado, a maior fonte de ROS parece ser mediada pela presença de AA no interior da célula, cujo influxo é feito diretamente pelo SVCT-1 e pelo SVCT-2, mas também por uma via indireta mediada pelo GLUT-1. Uma vez no interior da célula, a conversão de AA em radical ascorbil disponibiliza eletrões ao oxigénio molecular, aumentando a produção intracelular de radical superóxido. O aumento desta ROS poderá ser responsável pela disrupção abrupta do  $\Delta\psi_m$ , com consequente desencadeamento da via intrínseca da apoptose, com ativação da caspase-9. Concentrações mais elevadas de AA irão originar maior produção de radical superóxido, com maior impacto na disfunção mitocondrial e consequente depleção de ATP a um nível que comprometa a sobrevivência da célula e o término do processo apoptótico, culminando assim em morte celular por necrose. Para além disso, o radical superóxido poderá reagir com o óxido nítrico com formação de peroxinitrito, RNS responsável pela fragmentação do DNA e pela morte celular.

A exposição das células da linha LSI034 a concentrações crescentes de ácido ascórbico levou ao aumento da expressão membranar de GLUT-3 e de SVCT-2, assim como, ao aumento da percentagem de captação ao longo do tempo do complexo radiomarcado  $^{99m}\text{Tc-AA}$  relativamente ao  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Estes dados indicam que nesta linha celular o AA entra na célula onde irá exercer o seu efeito citotóxico. Aparentemente, quando presente em baixas concentrações (5 mM), o AA é preferencialmente

transportado na sua forma oxidada via GLUT-3; contudo, quando presente em altas concentrações (20 mM) o transporte passa a ser por via direta, pelo SVCT-2.

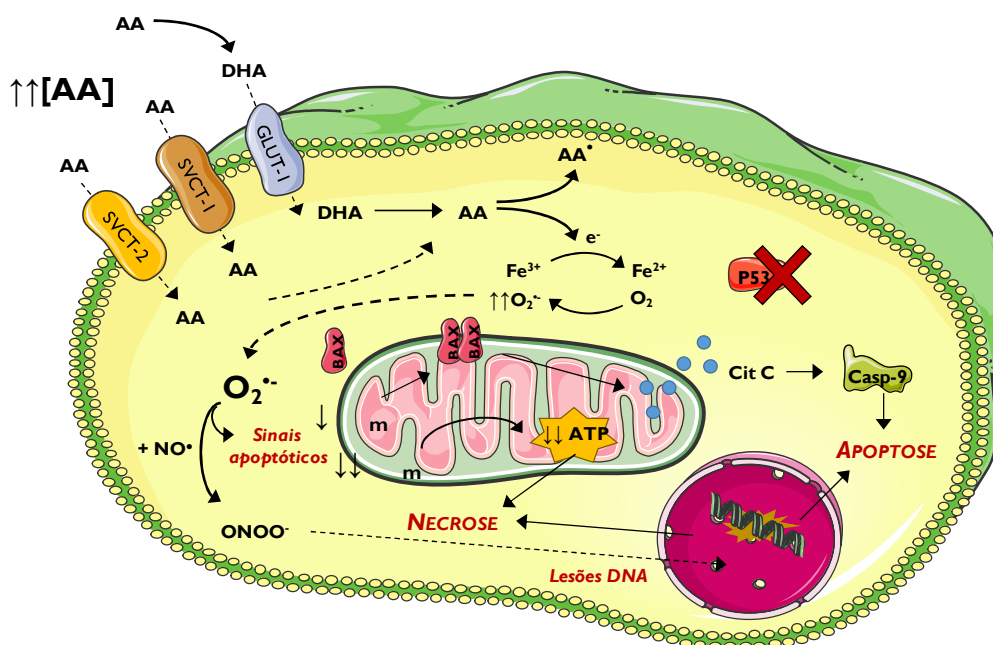


Figura 47: Esquema representativo do mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células C2BBel. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*). Legenda: AA, ácido ascórbico; DHA, ácido dehidroascórbico; GLUT-1, transportador GLUT-1; SVCT-1, transportador SVCT-1; SVCT-2, transportador SVCT-2; AA•, radical ascorbil; e<sup>-</sup>, eletrão; Fe<sup>3+</sup>, ião férrico; Fe<sup>2+</sup>, ião ferroso; O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, radical superóxido; m, potencial de membrana mitocondrial; BAX, proteína BAX; Cit C, citocromo C; Casp-9, caspase-9; ATP, adenosina trifosfato; NO•, óxido nítrico; ONOO•, peroxinitrito; P53, proteína P53.

Em suma, tal como ilustrado na Figura 48, os dados obtidos na linha celular LSI034 sugerem que elevadas concentrações de ácido ascórbico são capazes de ultrapassar os mecanismos de resistência e de adaptação ao aumento de stresse oxidativo inerentes a esta linha celular, com inibição da proliferação, perda da capacidade clonogénica, diminuição da viabilidade celular e indução de morte por apoptose. O mecanismo de ação do AA na linha celular LSI034 é independente de ROS e da P53, mas dependente da sua entrada na célula. Uma vez no interior da célula, o AA irá ativar uma via de morte celular por apoptose independente de caspases. O aumento da proteína pró-apoptótica BAX e a disrupção do  $\Delta\psi_m$  resultarão na libertação da proteína AIF da mitocôndria para o núcleo. No núcleo, a proteína AIF irá exercer a sua função

pró-apoptótica iniciando a fragmentação do DNA que conduzirá a célula até à morte.

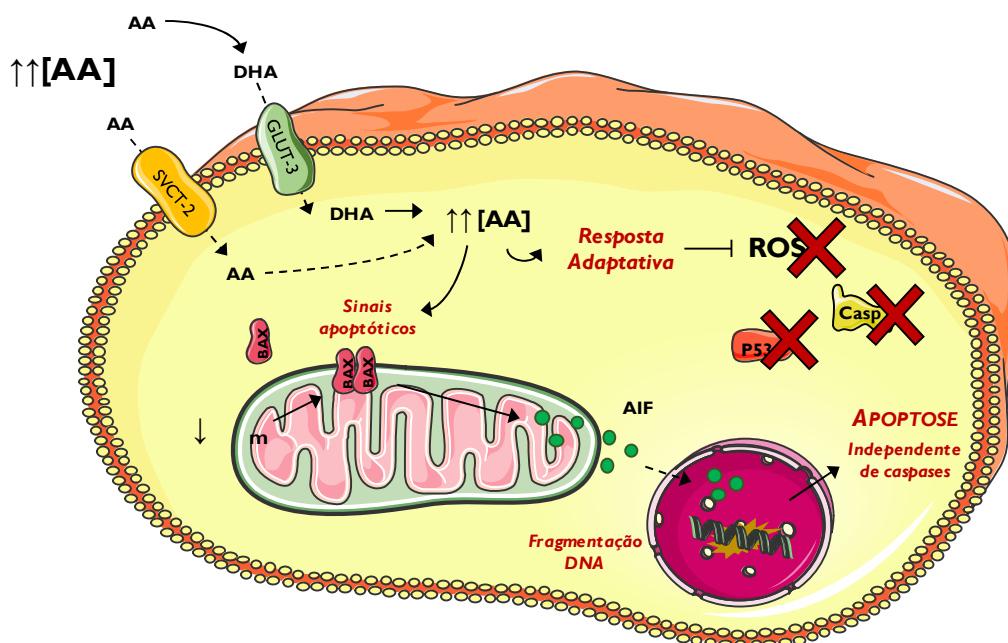


Figura 48: Esquema representativo do mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células LS1034. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*). Legenda: AA, ácido ascórbico; DHA, ácido dehidroascórbico; GLUT-3, transportador GLUT-3; SVCT-2, transportador SVCT-2; ROS, espécies reativas de oxigênio;  $\psi_m$ , potencial de membrana mitocondrial; BAX, proteína BAX; AIF, proteína mitocondrial indutora de apoptose; P53, proteína P53; Casp, caspases.

Nas células da linha WiDr, os estudos de farmacocinética indicaram que concentrações crescentes de ácido ascórbico induzem o aumento da expressão membranar dos transportadores de glicose, o GLUT-1 e o GLUT-3, contudo, não alteram a expressão de SVCT-1 nem de SVCT-2. Os estudos de captação mostram não haver diferenças entre a captação do complexo radiomarcado  $^{99m}\text{Tc-AA}$  e do controlo  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . Tendo em conta que o DHA é transportado pelos GLUTs em minutos (May *et al*, 2003), os dados obtidos sugerem que o aumento da expressão membranar de GLUT-1 e de GLUT-3 não se traduziu na captação de AA para o interior da célula, nem por via direta nem por via indireta. Desta forma, conclui-se que na linha celular WiDr o AA exerce a sua função anti-tumoral apenas a nível extracelular. A ação citotóxica e genotóxica do AA sem requerer a sua acumulação intracelular é um mecanismo de ação sugerido por diversos autores em vários tipos de cancro e linhas celulares (Chen *et al*,

2007, 2015a; Duarte *et al*, 2007).

Em suma, tal como ilustrado na Figura 49, nas células WiDr, o mecanismo de citotoxicidade é desencadeado pela auto-oxidação do AA no meio extracelular que irá mediar a produção de radical superóxido e, por ação da SOD, a formação de peróxido de hidrogénio. A difusão passiva do peróxido de hidrogénio e a sua reduzida reatividade permite a difusão pela célula.

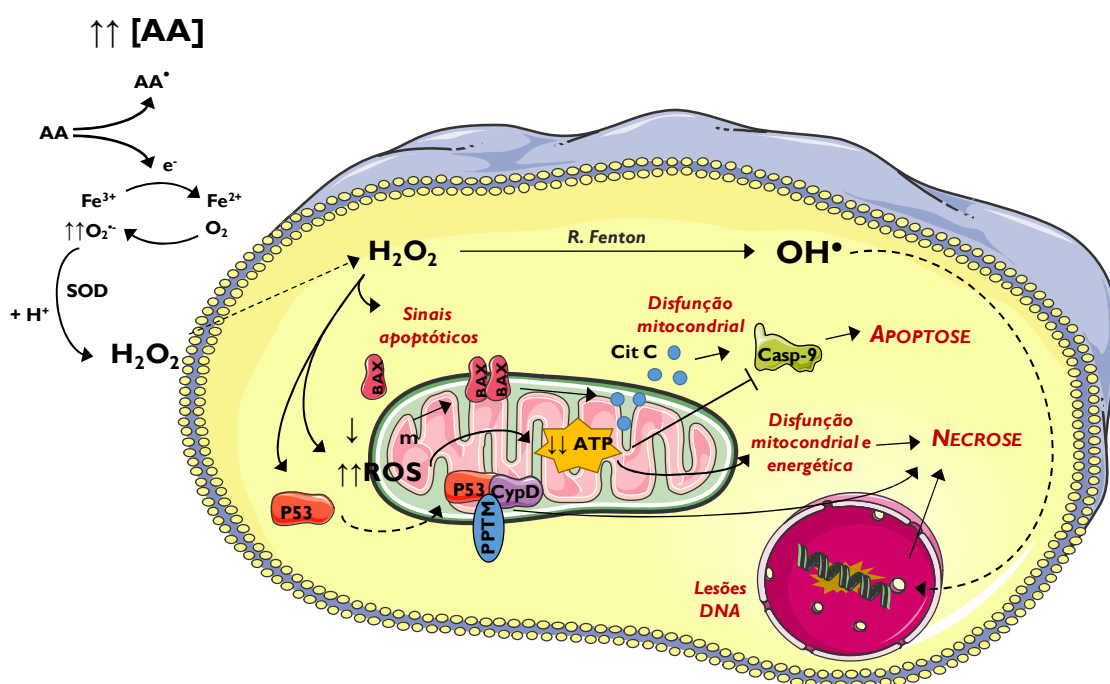


Figura 49: Esquema representativo do mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células WiDr. Elaborado com recurso a Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Legenda: AA, ácido ascórbico; AA•, radical ascorbil; e⁻, eletrão; Fe³⁺, íon férrico; Fe²⁺, íon ferroso; O₂•⁻, radical superóxido; SOD, superóxido dismutase; OH•, radical hidroxilo; m, potencial de membrana mitocondrial; BAX, proteína BAX; Cit C, citocromo C; Casp-9, caspase-9; ROS, espécies reativas de oxigénio; ATP, adenosina trifosfato; P53, proteína P53; Cyp D, ciclopilina D; PPTM, poro de permeabilidade transitória mitocondrial.

Quanto maior a concentração de AA, mais intenso será o estímulo oxidativo com maior produção de ROS. Uma vez dentro da célula, o peróxido de hidrogénio irá converter-se em radical hidroxilo, pela reação de *Fenton*, uma ROS capaz de interagir com várias moléculas, nomeadamente induzir lesões no DNA, lípidos e proteínas. O aumento de stresse oxidativo conduzirá à despolarização da membrana externa

mitocondrial e, naturalmente, ao desencadeamento de morte celular por apoptose. Concentrações de AA mais elevadas induzem disfunção mitocondrial acrescida de disfunção energética que promove a depleção de ATP. Na ausência de ATP, as caspases são inibidas e o processo apoptótico não ocorre, fenómeno que conduz a célula à morte por necrose. Paralelamente, o aumento do stresse oxidativo induz a acumulação da P53 na matriz mitocondrial com desencadeamento da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial e, posteriormente, do processo necrótico por interação física com a CypD.



---

## CAPÍTULO V – VITAMINA C E SEU EFEITO QUIMIOSENSIBILIZANTE

É uma evidência a necessidade de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do cancro, nomeadamente do cancro colorretal (Prasad *et al*, 1999). Aproximadamente 50% dos doentes com cancro colorretal terão uma evolução incurável da doença, quer seja recorrência local ou metastática. Tanto estes doentes como aqueles que são candidatos a tratamento de quimioterapia noutra estadia da doença serão tratados com regimes de quimioterapia, idealmente de primeira linha. Regimes de combinação de 5-FU/LV com oxaliplatina (FOLFOX) ou de 5-FU/LV com irinotecano (FOLFIRI) providenciam taxas de resposta elevadas, maior sobrevivência livre de progressão da doença e maior taxa de sobrevivência em comparação com a administração de 5-FU/LV isoladamente (Oostendorp *et al*, 2010; Catenacci *et al*, 2011). Contudo, além dos benefícios destes regimes terapêuticos, os potenciais riscos e privação de qualidade de vida dos doentes têm de ser avaliados, tendo em conta os inúmeros efeitos secundários e toxicidade inerentes a estas terapias. Assim, uma das abordagens, que há muito tem sido proposta por diversos autores, é a combinação de concentrações farmacológicas de vitamina C com concentrações reduzidas de fármacos quimioterapêuticos convencionalmente usados, de modo a diminuir os seus efeitos adversos (Espey *et al*, 2011; Vollbracht *et al*, 2011; Gilloteaux *et al*, 2014; Ma *et al*, 2014).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo visa apresentar a descrição de todas as metodologias necessárias à concretização dos estudos de combinação do AA com a quimioterapia convencional. Esta avaliação incluiu a realização de estudos *in vitro* e culminou na sua translação para o ambiente *in vivo*, utilizando modelos animais de cancro colorretal.

### Estudos *in vitro*

Foi estudado o efeito da combinação de ácido ascórbico com três fármacos de quimioterapia convencional, nomeadamente o 5-FU, a oxaliplatina e o irinotecano. Para tal, este estudo teve por base o desenho experimental proposto por *Straetemans et al.* que visa averiguar a presença de sinergia entre dois compostos através de um modelo paramétrico de desenho em raio (*Straetemans et al, 2005*). Os compostos são combinados em quantidades tais que a proporção entre eles seja constante. O cálculo das concentrações de cada composto, necessárias para a execução dos ensaios experimentais, foi feito considerando a mistura  $Z$  e de acordo com a equação 6,

$$Z = fA + (1 - f)B \quad (6)$$

em que  $A$  corresponde ao  $IC_{50}$  do ácido ascórbico e  $B$  ao do fármaco quimioterapêutico, determinados para um tempo de incubação de 96 horas; e  $f$  é considerado o fator de mistura, que pode assumir valores de 0 a 1, e que corresponde à proporção em que os compostos são combinados. Para o cálculo do valor de  $Z$ , estabeleceu-se o valor de  $f$  como sendo 0,5 (em que ambos os compostos estão na mesma proporção) ou 0,75 (com o ácido ascórbico em maior proporção do que o agente quimioterapêutico). O desenho em raios está ilustrado na Figura 50, onde cada raio corresponde a um valor  $f$  específico e os pontos representam as diferentes combinações de concentrações de compostos.

O fármaco irinotecano, doravante designado por Iri no capítulo dos resultados,



foi cedido pelos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no âmbito de um protocolo previamente estabelecido, enquanto o 5-FU (Sigma, F6627) e a oxaliplatina (Sigma, O9512), doravante designada por Oxa no capítulo dos resultados, foram adquiridos comercialmente. Antes da aplicação do modelo experimental de combinação de fármacos, foi necessário determinar o valor de  $IC_{50}$  dos fármacos quando administrados isoladamente nas células das três linhas tumorais em estudo. Para tal, trataram-se as células com concentrações crescentes de 5-FU (0,5 a 480  $\mu$ M), de Iri (5 a 200  $\mu$ M) ou de Oxa (1 a 120  $\mu$ M). Para os ensaios com 5-FU e com Iri, foram realizados dois controlos: culturas celulares em que não houve administração de nenhum composto e culturas celulares tratadas com o solvente do 5-FU e do Iri, ou seja, com DMSO.

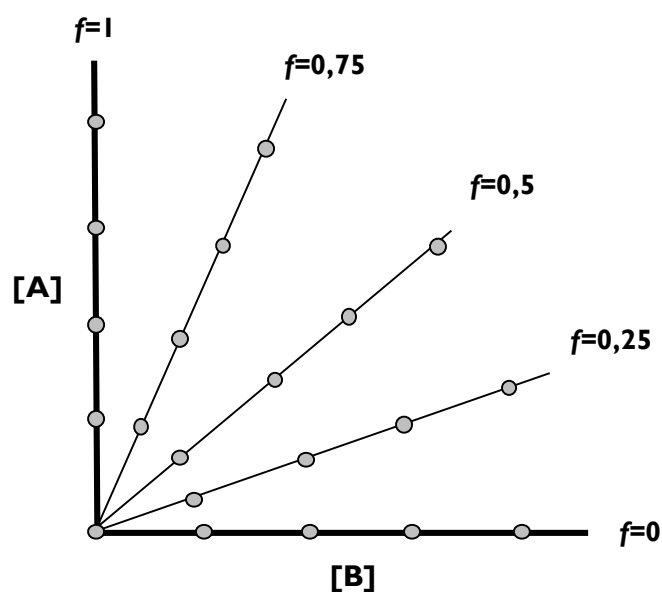


Figura 50: Representação do esquema de raios para combinação de fármacos. O eixo das abcissas corresponde à concentração do composto B (fármaco quimioterapêutico) e o eixo das ordenadas corresponde à concentração do composto A (AA). Cada raio corresponde a um valor específico de  $f$  e os pontos representam as diferentes combinações usadas para cada valor de  $f$ . Adaptado de (Straetemans *et al*, 2005).

### **Avaliação da proliferação celular pelo ensaio SRB**

A avaliação da proliferação celular foi feita usando o método do SRB descrito

anteriormente no Capítulo III, com posterior cálculo dos respectivos valores de  $IC_{50}$ . No caso do 5-FU e do Iri, a percentagem de proliferação foi calculada relativamente às culturas tratadas com DMSO, correspondendo esta a 100%.

Após a obtenção de todos os valores de  $IC_{50}$  dos vários compostos em monoterapia, foi possível calcular o valor de  $Z$  para  $f=0,5$  e para  $f=0,75$ . Posteriormente definiram-se sete variações crescentes deste valor, o que correspondeu a sete combinações diferentes em cada linha celular, de acordo com a Tabela 7 e a Tabela 8. Após incubação das células tumorais com as respectivas concentrações de ácido ascórbico em combinação com o fármaco (5-FU, Oxa ou Iri) durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas, avaliou-se a proliferação celular através do ensaio SRB, de acordo com o método descrito anteriormente e obtenção das respectivas curvas dose-resposta.

Para a obtenção das curvas dose-resposta, no eixo das ordenadas representou-se a percentagem de proliferação celular relativamente ao controlo e no eixo das abcissas representou-se o logaritmo de  $a$ , onde  $a$  representa os valores que se multiplicam pela constante  $Z$  para obter as diferentes combinações. Para  $f=0,5$ , a escolha de valores de  $a$  superiores a 2 implica o uso de concentrações superiores às do  $IC_{50}$ . Por outro lado, o facto dos valores de  $a$  variarem consoante a linha celular deve-se às diferenças dos  $IC_{50}$  obtidos em monoterapia e às concentrações de AA que podem ser usadas, as quais são limitadas pela solubilidade máxima do AA em água. Em suma, os valores de  $a$  foram escolhidos tendo em conta três fatores: o  $IC_{50}$  do AA obtido para cada linha celular, a solubilidade do AA em água e a obtenção de curvas dose-resposta que nos permitissem determinar a existência ou não de sinergia inerente à combinação dos compostos. A aplicação do modelo matemático paramétrico proposto por Straetemans *et al.* permitiu ainda calcular o índice de combinação ( $IC$ ) e, assim, averiguar a existência de efeito sinérgico ( $IC < 1$ ), de efeito aditivo ( $IC = 1$ ) ou de efeito antagónico ( $IC > 1$ ) (Straetemans *et al.*, 2005).

Tabela 7: Concentrações de ácido ascórbico (AA), 5-Fluorouracilo (5-FU), oxaliplatina (Oxa) e irinotecano (Iri) presentes em cada mistura, para  $f=0,5$ , para avaliar a proliferação celular das células das linhas C2BBe1, LSI034 e WiDr.

C2BBe1							
Condições	Variações de Z ( $\alpha Z$ )	AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		[AA] (mM)	[5-FU] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Oxa] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Iri] ( $\mu$ M)
A1	0.25Z	0.10	2.51	0.10	0.28	0.10	1.48
A2	0.5Z	0.20	5.03	0.20	0.55	0.20	2.97
A3	Z	0.41	10.05	0.41	1.11	0.41	5.93
A4*	2Z	0.82	20.10	0.82	2.21	0.82	11.87
A5	4Z	1.64	40.20	1.64	4.42	1.64	23.73
A6	6Z	-	-	2.45	6.63	2.45	35.60
A7	8Z	3.27	80.40	3.27	8.84	3.27	47.46

LSI034							
Condições	Variações de Z ( $\alpha Z$ )	AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		[AA] (mM)	[5-FU] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Oxa] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Iri] ( $\mu$ M)
A1	0.25Z	0.67	0.84	0.67	0.25	0.67	0.59
A2	0.5Z	1.34	1.67	1.34	0.50	1.34	1.19
A3	Z	2.68	3.35	2.68	1.01	2.68	2.38
A4	1.5Z	4.03	5.02	4.03	1.51	4.03	3.57
A5*	2Z	5.37	6.69	5.37	2.01	5.37	4.76
A6	3Z	8.05	10.04	8.05	3.02	8.05	7.14
A7	4Z	-	-	10.73	4.02	10.73	9.52

WiDr							
Condições	Variações de Z ( $\alpha Z$ )	AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		[AA] (mM)	[5-FU] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Oxa] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Iri] ( $\mu$ M)
A1	0.25Z	0.74	0.35	0.74	1.03	0.74	0.22
A2	0.5Z	1.48	0.71	1.48	2.05	1.48	0.44
A3	Z	2.95	1.41	2.95	4.11	2.95	0.88
A4	1.5Z	4.43	2.12	4.43	6.16	4.43	1.33
A5*	2Z	5.90	2.82	5.90	8.21	5.90	1.77
A6	3Z	8.86	4.23	8.86	12.32	8.86	2.65
A7	4Z	-	-	11.81	16.42	11.81	3.54

\*Condição correspondente à combinação dos  $IC_{50}$  de ambos os compostos.  $\alpha$  representa os valores crescentes multiplicados pela constante Z para obtenção das diferentes combinações.

Tabela 8: Concentrações de ácido ascórbico (AA), 5-Fluorouracilo (5-FU), oxaliplatina (Oxa) e irinotecano (Iri) presentes em cada mistura, para  $f=0,75$ , para avaliar a proliferação celular das células das linhas C2BBe1, LSI034 e WiDr.

C2BBe1							
Condições	Variações de Z ( $\alpha Z$ )	AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		[AA] (mM)	[5-FU] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Oxa] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Iri] ( $\mu$ M)
B1	0.25Z	0.15	1.26	0.15	0.14	0.15	0.74
B2	0.5Z	0.31	2.51	0.31	0.28	0.31	1.48
B3	Z	0.61	5.03	0.61	0.55	0.61	2.97
B4	2Z	1.23	10.05	1.23	1.11	1.23	5.93
B5	4Z	2.45	20.10	2.45	2.21	2.45	11.87
B6	6Z	-	-	3.68	3.32	3.68	17.80
B7	8Z	4.91	40.20	4.91	4.42	4.91	23.73

LSI034							
Condições	Variações de Z ( $\alpha Z$ )	AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		[AA] (mM)	[5-FU] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Oxa] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Iri] ( $\mu$ M)
B1	0.25Z	1.01	0.42	1.01	0.13	1.01	0.30
B2	0.5Z	2.01	0.84	2.01	0.25	2.01	0.59
B3	Z	4.03	1.67	4.03	0.50	4.03	1.19
B4	1.5Z	6.04	2.51	6.04	0.75	6.04	1.78
B5	2Z	8.05	3.35	8.05	1.01	8.05	2.38
B6	3Z	12.08	5.02	12.08	1.51	12.08	3.57
B7	4Z	-	-	16.10	2.01	16.10	4.76

WiDr							
Condições	Variações de Z ( $\alpha Z$ )	AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		[AA] (mM)	[5-FU] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Oxa] ( $\mu$ M)	[AA] (mM)	[Iri] ( $\mu$ M)
B1	0.25Z	1.11	0.18	1.11	0.51	1.11	0.11
B2	0.5Z	2.21	0.35	2.21	1.03	2.21	0.22
B3	Z	4.43	0.71	4.43	2.05	4.43	0.44
B4	1.5Z	6.64	1.06	6.64	3.08	6.64	0.66
B5	2Z	8.86	1.41	8.86	4.11	8.86	0.88
B6	3Z	13.28	2.12	13.28	6.16	13.28	1.33
B7	4Z	-	-	17.71	8.21	17.71	1.77

$\alpha$  representa os valores crescentes multiplicados pela constante Z para obtenção das diferentes combinações.

## **Análise do ciclo, viabilidade e morte celulares**

Com o intuito de avaliar o efeito da terapia combinada no ciclo celular, assim como, na viabilidade celular e nos tipos de morte celular induzida, as células foram tratadas durante 48 horas com as concentrações descritas na Tabela 9. Para as condições cujo efeito anti-proliferativo foi mais notório, avaliou-se também o potencial de membrana mitocondrial, a expressão das proteínas BAX e BCL-2 e a expressão do recetor VEGF-R1 por citometria de fluxo, e a expressão da caspase-9 e da proteína P53 por *western blot*.

Os protocolos de citometria de fluxo utilizados foram os descritos previamente no Capítulo IV. Na análise por *western blot*, utilizaram-se os métodos descritos anteriormente, excetuando o passo da eletrotransferência. Nestes estudos a eletrotransferência foi realizada em meio semi-húmido, com recurso ao equipamento Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad), com intensidade de corrente constante de 1,3 A durante 7 minutos para a deteção da P53, e intensidade de corrente constante de 1,5 A durante 10 minutos para a deteção da caspase-9. Os restantes passos foram feitos de acordo com os métodos descritos no Capítulo IV para a análise destas proteínas.

Tabela 9: Concentrações de ácido ascórbico (AA), 5-Fluorouracilo (5-FU), oxaliplatina (Oxa) e irinotecano (Iri) utilizadas na terapia combinada das células das linhas C2BBel, LS1034 e WiDr para a realização dos estudos de citometria de fluxo e *western blot*.

<b>Linha celular</b>	<b>AA + 5-FU</b>			<b>AA + Oxa</b>			<b>AA + Iri</b>		
	Cond.	[AA] (mM)	[5-FU] (μM)	Cond.	[AA] (mM)	[Oxa] (μM)	Cond.	[AA] (mM)	[Iri] (μM)
<b>C2BBel</b>	B4	1,23	10,05	B3	0,61	0,55	B4	1,23	5,93
<b>LS1034</b>	B5	8,05	3,35	B3	4,03	0,50	B3	4,03	1,19
<b>WiDr</b>	B5	8,86	1,41	B3	4,43	2,05	B4	6,64	0,66

## **Estudos *in vivo***

No desenvolvimento de novas terapias para o combate de doenças como o

cancro, a comunidade científica depende fortemente de estudos com animais, os quais providenciam um quadro de respostas que servem de base para os ensaios clínicos (Reagan-Shaw *et al*, 2008). Assim, os estudos *in vivo* são ferramentas que permitem avaliar questões biológicas de grande impacto clínico. A sua realização é por isso imprescindível, na medida em que estes estudos envolvem toda a complexidade conferida pelos órgãos e sistemas e suas interações, incluindo a interveniência do microambiente tumoral.

### ***Desenvolvimento do modelo xenotransplante***

Com os estudos seguidamente descritos, pretendeu-se averiguar o efeito da combinação do ácido ascórbico com os três fármacos convencionalmente utilizados em regimes quimioterapêuticos num modelo em que estivesse presente o microambiente tumoral. Para tal utilizou-se um modelo animal de xenotransplante heterotópico, caracterizado pela inoculação das células tumorais humanas, por via subcutânea, num local diferente do seu local de origem. Apesar das células tumorais não serem inoculadas no seu local de origem, este modelo animal apresenta inúmeras vantagens que justificam a sua utilização. Entre elas destaca-se a obtenção de massas tumorais sólidas, claramente visíveis e de localização atingível que favorece a monitorização diária do volume tumoral, e que aumenta a facilidade de acesso para a execução de biópsias. A área inoculada é, usualmente, uma área de boa expansão devido à mobilidade da pele, e uma área bastante vascularizada o que contribui para o desenvolvimento rápido do tumor (Priolli *et al*, 2012).

Para o desenvolvimento do modelo animal utilizaram-se ratinhos *Balb/c nu/nu*, adquiridos aos Laboratórios Internacionais *Charles River, Inc* (Espanha). Os animais foram mantidos em sala de climatização adequada, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias. Esta estirpe de ratinhos imunodeprimidos é portadora de uma mutação no cromossoma 11 (*Foxn1nu-*), que resulta na ausência de timo e conseqüente escassa produção de células T, tornando-os capazes de aceitar células humanas sem posterior rejeição (Priolli *et al*, 2012; Campbell & Dachs, 2014). Para a concretização deste estudo foram utilizados 50 animais. Os ensaios foram realizados de acordo com os requisitos nacionais para a

pesquisa em animais vertebrados descritos na Diretiva 2010/63/EU e estabelecidos pela *Convenção Europeia sobre a Proteção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos*.

Apesar de várias tentativas terem sido feitas com o intuito de desenvolver xenotransplantes das três linhas celulares, o procedimento não foi eficaz e reprodutível com as células C2BBel e LSI034. Desta forma, apenas foram desenvolvidos xenotransplantes da linha celular WiDr. Tendo em vista a obtenção dos mesmos, cerca de 7 milhões de células da linha celular WiDr foram inoculadas no dorso de cada animal. Após a inoculação das células, o peso e o crescimento tumoral foi monitorizado de dois em dois dias. Também foi dada atenção ao comportamento e estado geral de saúde dos animais. O volume tumoral foi determinado através da equação 7,

$$V = \frac{E_M \times (E_m)^2}{2} \quad (7)$$

em que  $E_M$  representa o eixo maior do tumor e  $E_m$  o eixo menor (Dagrosa *et al*, 2003). Os tratamentos foram iniciados quando os tumores atingiram um volume de 300 a 500 mm<sup>3</sup>.

## **Tratamento**

De acordo com o objetivo experimental, foram utilizados oito grupos de animais: (I) grupo controlo, constituído por 6 ratinhos, não sujeito a qualquer tratamento; (II) grupo AA, constituído por 8 ratinhos, sujeito a monoterapia com ácido ascórbico; (III) grupo 5-FU, constituído por 6 ratinhos, sujeito a monoterapia com 5-fluorouracilo; (IV) grupo AA+5-FU, constituído por 4 ratinhos, sujeito à terapia combinada de AA e 5-FU; (V) grupo Oxa, constituído por 6 ratinhos, sujeito a monoterapia com Oxa; (VI) grupo AA+Oxa, constituído por 6 ratinhos, sujeito à terapia combinada de AA e Oxa; (VII) grupo Iri, constituído por 6 ratinhos, sujeito a monoterapia com Iri; (VIII) grupo AA+Iri, constituído por 8 ratinhos, sujeito à terapia combinada de AA e Iri. Tendo em conta a política dos 3R's (reduzir, reutilizar e reciclar) aplicada aos estudos com animais, não se

constituiu um grupo controlo para o veículo de administração de cada composto, uma vez que os veículos de administração usados foram água ou NaCl a 0,9%. Nestes estudos, ao contrário dos estudos *in vitro*, foi possível a utilização de água e de NaCl como veículo de administração de 5-FU e de Iri, respetivamente, ao invés de DMSO. A administração de volumes maiores permite a utilização de soluções com concentrações de fármaco muito inferiores às concentrações necessárias para os estudos *in vitro*, em que os volumes de fármaco a administrar são muito reduzidos e, conseqüentemente, implicam o uso de soluções mais concentradas que ultrapassam, muitas vezes, o limite de solubilidade do 5-FU em água e do Iri em NaCl.

Os esquemas de administração dos compostos tiveram por base a literatura existente, considerando-se o dia 0, aquele em que se iniciou a terapia. O tratamento com AA (grupo II) foi baseado no protocolo utilizado por *Mamede et al.* e consistiu na administração diária de uma solução aquosa de ácido ascórbico na concentração de 150 mg/kg, injetada por via intraperitoneal, nos dias 0 a 4 e nos dias 7 a 11 (*Mamede et al.*, 2012b). Para o tratamento com 5-FU (grupo III) adaptou-se o protocolo utilizado por *Pegram et al.*, em que o 5-FU foi administrado por via intraperitoneal na concentração de 2 mg/kg, dissolvido em água, aos dias 0 e 7 (*Pegram et al.*, 1999). O tratamento com Oxa (grupo V) foi adaptado do protocolo de *Al Moundhri et al.*, com a administração via intraperitoneal de uma solução aquosa de Oxa (4 mg/kg) aos dias 0, 3 e 7. (*Al Moundhri et al.*, 2013). O tratamento com Iri (grupo VII) teve por base o protocolo de *Guichard* e seus coautores e consistiu na injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de uma solução de irinotecano em NaCl a 0,9% aos dias 0, 4 e 8 (*Guichard et al.*, 1998). A terapia combinada consistiu na junção dos dois protocolos de administração, nomeadamente, do ácido ascórbico em monoterapia e dos respetivos fármacos em monoterapia.

A monitorização dos animais foi feita de dois em dois dias, durante 14 dias, e incluiu a medição dos eixos dos xenotransplantes para cálculo do volume tumoral com recurso a um paquímetro digital, pesagem, observação e registo do estado de saúde geral do animal. Após a terapia, os ratinhos foram occisados por deslocamento cervical e os tumores retirados para a realização de estudos *ex vivo*.



## **Análise histológica**

Os tumores excisados foram fixados em formol (VWR Chemicals, 90240) a 10% e enviados para o laboratório de anatomia patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. As peças foram posteriormente inclusas em parafina, e feitos cortes histológicos para observação microscópica. Para análise do índice de proliferação, as amostras foram marcadas com o anticorpo anti-KI67 (Santa Cruz Biotechnology, sc-23900) e analisadas em equipamento dedicado.

## **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® 20.0 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas e da homogeneidade de variâncias foi feita de acordo com os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respetivamente. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e homogeneidade de variância e testes não paramétricos em caso contrário.

As comparações entre condições terapêuticas de diferentes fármacos ou concentrações de fármaco (para cada linha celular) foram realizadas segundo o teste ANOVA de um fator, no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias, ou segundo o teste *Kruskal-Wallis*, em caso contrário. A comparação de dois grupos não pareados foi realizada segundo o teste de *Mann-Whitney*. As comparações múltiplas em caso de variâncias não presumidas foram realizadas segundo o teste de *Games-Howell* ou com a correção de *Bonferroni* em caso contrário.

Na análise inferencial dos estudos *in vivo*, foi determinado o volume tumoral relativo (VTR) para cada dia de medição, de acordo com a equação 8,

$$VTR = \frac{V_d}{V_0} \quad (8)$$

onde  $V_d$  é o volume tumoral no dia  $d$  e  $V_0$  é o volume tumoral inicial.

Para os estudos *in vivo*, foi utilizada a estimativa de *Kaplan-Meier*, definindo como evento a obtenção de um VTR>2,5. Foi estimado o tempo mediano (em dias) necessário para atingir o evento segundo este método. A comparação das curvas obtidas entre grupos experimentais foi realizada segundo o teste de *log-rank*, com comparações múltiplas utilizando a correção de *Bonferroni*.

Considerou-se um erro de tipo I de 0,05 para todas as comparações.

## RESULTADOS

A potencial sinergia proveniente da combinação do ácido ascórbico com fármacos convencionalmente utilizados no tratamento do cancro colorretal poderá diminuir os efeitos adversos induzidos pela quimioterapia. A redução da toxicidade poderá permitir aos doentes tolerar maiores concentrações de quimioterapia, mantendo ou melhorando a sua eficácia. Seguindo este racional e com recurso a estudos *in vitro* e *in vivo*, estudou-se o potencial da combinação do ácido ascórbico com o 5-FU, a oxaliplatina (Oxa) ou o irinotecano (Iri), fármacos integrantes dos principais regimes de quimioterapia usados no tratamento do CCR.

### Estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro* incluíram a avaliação do efeito das terapias combinadas na proliferação celular, nas alterações do ciclo celular, na viabilidade celular e nas vias de morte ativadas. Para estudar as vias de morte implicadas analisaram-se as alterações do potencial de membrana mitocondrial, da expressão das proteínas BAX, BCL-2 e caspase-9. A expressão da proteína P53 e do recetor I do VEGF foi também avaliada.

## Proliferação celular

Após o tratamento das células com a combinação do ácido ascórbico com o 5-FU, do ácido ascórbico com a Oxa ou do ácido ascórbico com o Iri, segundo o desenho experimental em raio descrito na secção dos Materiais e Métodos, a proliferação celular foi avaliada com recurso ao ensaio de SRB. O fator de mistura  $f$  assumiu valores de 0,5 (caso em que ambos os compostos estão na mesma proporção) ou de 0,75 (caso em que o AA está em maior proporção que o fármaco em estudo). O modelo de combinação permitiu a determinação dos valores de  $IC_{50}$  dos fármacos quando presentes em terapia combinada com o AA. Os valores de  $IC_{50}$ , para cada valor de  $f$ , obtidos nas células C2BBe1, LSI034 e WiDr estão descritos na Tabela 10, na Tabela 11 e na Tabela 12, respetivamente. Estes são comparados com os valores de  $IC_{50}$  dos respetivos fármacos obtidos em monoterapia, isto é, na ausência de AA.

O modelo matemático utilizado para estudar o efeito da combinação dos compostos em comparação com o seu efeito isolado permitiu ainda o cálculo do índice de combinação ( $IC$ ), cujo valor indica a presença de efeito sinérgico ( $IC < 1$ ), de efeito aditivo ( $IC = 1$ ) ou de efeito antagónico ( $IC > 1$ ). A análise da Tabela 10, da Tabela 11 e da Tabela 12 respeitantes a cada linha celular será feita de seguida tendo por base os valores de  $IC$  descritos na Tabela 13.

Tabela 10: Valores de  $IC_{50}$  do 5-FU, Oxa e Iri, obtidos em monoterapia (MT) e em terapia combinada com o AA (TC) em regime de  $f=0,5$  ou de  $f=0,75$ , obtidos após tratamento das células C2BBe1 durante 24, 48, 72 e 96 horas.

Tempo (h)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )								
	5-FU			Oxa			Iri		
	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )
24	(a)	(a)	(a)	115,2	0,7	0,4	(b)	8,8	3,1
48	(b)	18,1	6,9	5,2	1,0	0,3	132,6	17,0	5,0
72	58,1	10,7	5,2	3,1	0,4	0,1	75,9	10,3	2,9
96	20,1	3,1	1,3	2,2	0,5	0,2	11,9	6,1	2,2

(a) representa condições que não foram avaliadas e (b) as condições em que não foi possível calcular o valor de  $IC_{50}$ .

De uma forma geral verifica-se que a presença de ácido ascórbico induziu uma diminuição do  $IC_{50}$  de todos os fármacos em todas as condições estudadas, comparativamente com o  $IC_{50}$  dos mesmos em monoterapia. Para além disso, quanto maior a proporção em que o AA está presente, menor a concentração de fármaco necessária para inibir a proliferação celular em 50%. Estes factos são transversais a todas as linhas celulares.

Tabela 11: Valores de  $IC_{50}$  do 5-FU, Oxa e Iri, obtidos em monoterapia (MT) e em terapia combinada com o AA (TC) em regime de  $f=0,5$  ou de  $f=0,75$ , obtidos após tratamento das células LS1034 durante 24, 48, 72 e 96 horas.

Tempo (h)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )								
	5-FU			Oxa			Iri		
	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )
24	(a)	(a)	(a)	31,9	3,9 <sup>(c)</sup>	0,5	83,4	3,2	(b)
48	238,0	6,3	2,6	5,9	0,5	0,4	47,5	1,4 <sup>(c)</sup>	0,5
72	15,4	6,3	1,4	1,9	1,2	0,3	8,1	4,3	1,1 <sup>(c)</sup>
96	6,7	1,5 <sup>(c)</sup>	0,8	2,0	0,6	0,3	4,8	1,5 <sup>(c)</sup>	0,5

(a) representa condições que não foram avaliadas, (b) as condições em que não foi possível calcular o valor de  $IC_{50}$  e (c) as condições em que o  $r^2$  obtido foi inferior a 0,9.

Numa primeira análise da Tabela 10 e relativamente ao efeito da terapia combinada de AA com 5-FU nas células C2BBel verifica-se que quando o AA estava em maior proporção ( $f=0,75$ ), o  $IC_{50}$  do 5-FU diminuiu em relação ao obtido em monoterapia mas também em relação à condição de  $f=0,5$ . Considerando o exemplo das 72 horas, o  $IC_{50}$  do 5-FU na ausência de AA (MT) foi 58,1  $\mu M$ , diminuindo para 10,7  $\mu M$  na presença de AA na mesma proporção ( $f=0,5$ ) e para 5,2  $\mu M$  na presença de AA em maior proporção ( $f=0,75$ ). Contudo, esta diminuição observada com a combinação de AA com 5-FU apenas se traduziu em efeito sinérgico às 96 horas (ver Tabela 13). A associação de AA com Oxa mostrou resultados promissores com redução da ordem de grandeza do  $IC_{50}$  da Oxa. Neste caso, verificou-se efeito sinérgico entre o AA e a Oxa, com a obtenção de valores de  $IC$  inferiores a 1 para todos os tempos de incubação e em ambos os regimes de combinação (ver Tabela 13). De realçar o efeito da presença do AA logo após 24 horas de incubação das células C2BBel com os compostos. Neste

caso, o  $IC_{50}$  da Oxa em monoterapia foi de 115,2  $\mu\text{M}$ , diminuindo drasticamente para 0,7  $\mu\text{M}$  e para 0,4  $\mu\text{M}$  na presença de AA em regime de  $f=0,5$  ou de  $f=0,75$ , respetivamente. Quanto à combinação de AA com Iri observou-se igualmente a diminuição do  $IC_{50}$  do Iri em todas as condições estudadas, no entanto, apenas se verificou a existência de sinergia às 96 horas no regime terapêutico em que o AA está em maior proporção ( $IC=0,75$ ). Neste caso, o  $IC_{50}$  do Iri na ausência de AA (MT) foi 11,9  $\mu\text{M}$ , reduzindo para 6,1  $\mu\text{M}$  na presença de AA na mesma proporção ( $f=0,5$ ) e para 2,2  $\mu\text{M}$  na condição de sinergia ( $f=0,75$ ).

Tabela 12: Valores de  $IC_{50}$  do 5-FU, Oxa e Iri, obtidos em monoterapia (MT) e em terapia combinada com o AA (TC), em regime de  $f=0,5$  ou de  $f=0,75$ , obtidos após tratamento das células WiDr durante 24, 48, 72 e 96 horas.

Tempo (h)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )								
	5-FU			Oxa			Iri		
	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )	MT	TC ( $f=0,5$ )	TC ( $f=0,75$ )
24	(a)	(a)	(a)	(b)	7,7	4,9	(b)	(b)	1,4
48	442,4	3,4	1,4	21,0	2,6	1,5	38,7	1,6	0,8
72	10,5	1,6	1,1	10,9	0,8	0,2	13,9	1,8	(b)
96	2,8	0,9	0,5	8,2	0,8	0,4	1,8	0,9 <sup>(c)</sup>	0,4

(a) representa condições que não foram avaliadas, (b) as condições em que não foi possível calcular o valor de  $IC_{50}$  e (c) as condições em que o  $r^2$  obtido foi inferior a 0,9.

Analisando a Tabela 11 verifica-se igualmente que o ácido ascórbico aumentou a sensibilidade das células LS1034 aos três fármacos em estudo. Este facto torna-se ainda mais evidente quando o AA estava presente em maior proporção ( $f=0,75$ ). O efeito sinérgico da combinação de AA com 5-FU apenas se verificou a partir das 72 horas (Tabela 13). Após 72 horas, o  $IC_{50}$  do 5-FU foi 15,4  $\mu\text{M}$  na ausência de AA, reduzindo para 1,4  $\mu\text{M}$  em regime de  $f=0,75$  ( $IC=0,81$ ). Às 96 horas, o  $IC_{50}$  do 5-FU foi 6,7  $\mu\text{M}$  na ausência de AA, reduzindo para 1,5  $\mu\text{M}$  em regime de  $f=0,5$  ( $IC=0,44$ ) e para 0,8  $\mu\text{M}$  em regime de  $f=0,75$  ( $IC=0,46$ ). Quando o AA foi combinado com a Oxa, observou-se sinergia logo após 48 horas de incubação, com diminuição do  $IC_{50}$  do fármaco, que passou de 5,9  $\mu\text{M}$  (em monoterapia) para 0,5  $\mu\text{M}$  (em regime  $f=0,5$ ;  $IC=0,51$ ) e para 0,4  $\mu\text{M}$  (em regime  $f=0,75$ ;  $IC=0,79$ ). À semelhança da combinação de AA com Oxa,

quando se associou o AA com o Iri, obteve-se efeito sinérgico logo após 48 horas. Neste caso, em monoterapia o  $IC_{50}$  do Iri foi de 47,5  $\mu$ M, enquanto em combinação com o AA em igual proporção foi de 1,4  $\mu$ M ( $IC=0,59$ ) e com o AA em maior proporção diminuiu ainda para 0,5  $\mu$ M ( $IC=0,39$ ).

Tabela 13: Valores dos índices de combinação ( $IC$ ) obtidos nas linhas celulares de cancro colorretal, para  $f=0,5$  e para  $f=0,75$ , e para cada tempo de incubação.

Linha Celular	Tempo (h)	Índice de Combinação ( $IC$ )					
		AA + 5-FU		AA + Oxa		AA + Iri	
		$f=0,5$	$f=0,75$	$f=0,5$	$f=0,75$	$f=0,5$	$f=0,75$
C2BBel	24	(a)	(a)	<b>0,62</b>	<b>0,67</b>	1,48	1,03
	48	1,80	1,37	<b>0,93</b>	<b>0,47</b>	2,87	1,68
	72	1,06	1,04	<b>0,38</b>	<b>0,22</b>	1,74	0,98
	96	<b>0,31</b>	<b>0,26</b>	<b>0,46</b>	<b>0,37</b>	1,02	<b>0,75</b>
LS1034	24	(a)	(a)	3,91	1,03	1,35	(b)
	48	1,88	1,53	<b>0,51</b>	<b>0,79</b>	<b>0,59</b>	<b>0,39</b>
	72	1,88	0,81	1,21	<b>0,61</b>	1,82	<b>0,91</b>
	96	<b>0,44</b>	<b>0,46</b>	<b>0,58</b>	<b>0,57</b>	<b>0,64</b>	<b>0,46</b>
WiDr	24	(a)	(a)	1,87	2,39	(b)	3,23
	48	2,43	1,99	<b>0,63</b>	<b>0,74</b>	1,80	1,79
	72	1,11	1,61	<b>0,20</b>	<b>0,08</b>	2,04	(b)
	96	<b>0,61</b>	<b>0,71</b>	<b>0,20</b>	<b>0,17</b>	1,07	<b>0,94</b>

(a) representa condições que não foram avaliadas e (b) as condições em que não foi possível calcular o valor de  $IC$ . A negrito evidenciam-se as condições em que se obteve efeito sinérgico ( $IC < 1$ ).

Os resultados obtidos para as células WiDr encontram-se descritos na Tabela 12 e evidenciam a diminuição do  $IC_{50}$  dos fármacos de forma dependente da presença e da concentração de ácido ascórbico. Pela análise simultânea da Tabela 13 verifica-se que o AA e o 5-FU atuam sinérgicamente após 96 horas de tratamento. Nesta condição observou-se uma diminuição do  $IC_{50}$  do 5-FU na presença de AA, tendo-se obtido o valor de 2,8  $\mu$ M na ausência de AA, 0,9  $\mu$ M na presença de AA em regime de  $f=0,5$  ( $IC=0,61$ ) e 0,5  $\mu$ M na presença de AA em regime de  $f=0,75$  ( $IC=0,71$ ). À semelhança das outras linhas celulares, a combinação de AA com Oxa nas células WiDr evidenciou um

efeito sinérgico para todos os tempos de incubação exceto às 24 horas. A título de exemplo evidencia-se o resultado das 72 horas em que o  $IC_{50}$  da Oxa em monoterapia foi de 10,9  $\mu$ M. Quando as células foram tratadas com a combinação de AA com Oxa o  $IC_{50}$  diminuiu para 0,8  $\mu$ M (em regime  $f=0,5$ ;  $IC=0,20$ ) e para 0,2  $\mu$ M (em regime  $f=0,75$ ;  $IC=0,08$ ). Nas células WiDr a combinação de AA com Iri não mostrou ser tão eficaz, verificando-se a existência de efeito sinérgico apenas às 96 horas e com maior proporção de AA. Neste caso, o  $IC_{50}$  do Iri em monoterapia foi de 1,8  $\mu$ M e diminuiu para 0,4  $\mu$ M (em regime  $f=0,75$ ;  $IC=0,94$ ).

### **Ciclo, viabilidade e morte celulares**

Após a avaliação do efeito da combinação dos compostos na proliferação celular, elegeram-se as condições que aparentavam ser mais promissoras às 48 horas de incubação em cada linha celular, para avaliar as alterações a nível do ciclo celular e da viabilidade e da morte celulares.

Os resultados estão representados na Figura 51, Figura 52 e na Figura 53 para a linha celular C2BBel, na Figura 54, na Figura 55 e na Figura 56 para a linha celular LS1034 e na Figura 57, na Figura 58 e na Figura 59 para a linha celular WiDr.

Para as células C2BBel usámos a concentração de AA de 1,23 mM e de 5-FU de 10,05  $\mu$ M. Analisando a Figura 51 verificamos que quando as células C2BBel foram tratadas com a combinação de ácido ascórbico com 5-FU se deu um bloqueio do ciclo celular em fase S, com  $p=0,048$  em relação ao controlo e  $p=0,014$  em relação ao tratamento com AA em monoterapia. Consequentemente, registou-se uma diminuição percentual significativa das células em fase G0/G1, comparativamente com o controlo ( $p=0,001$ ) e com o tratamento com AA ( $p=0,023$ ). Nas células tratadas com a combinação de AA e 5-FU também se verificou a presença do pico apoptótico, com  $p=0,018$  em relação ao controlo e  $p=0,035$  em relação ao tratamento com 5-FU. É de referir que o bloqueio em fase S ( $p=0,012$ ) com diminuição percentual das células em fase G0/G1 ( $p<0,001$ ) foi igualmente observado na monoterapia com 5-FU.

Paralelamente, com a combinação de ácido ascórbico com 5-fluorouracilo, a viabilidade celular decresceu significativamente ( $p < 0,001$ ) de  $85,2 \pm 0,5\%$  para  $21,8 \pm 3,9\%$ , com conseqüente aumento significativo ( $p = 0,002$ ) de morte celular, de  $14,8 \pm 0,5\%$  no controlo para  $78,2 \pm 3,9\%$  no tratamento combinado, morte esta que foi essencialmente por necrose ( $49,2 \pm 8,6\%$ ). Verifica-se igualmente com este tratamento o aumento da percentagem de células em apoptose tardia/necrose, que passou de  $1,7 \pm 0,3\%$  para  $25,0 \pm 11,2\%$ . A percentagem de células vivas obtida após a terapia combinada ( $21,8 \pm 3,9\%$ ) foi estatisticamente inferior ( $p < 0,001$ ) à obtida após tratamento com 5-FU em monoterapia ( $58,2 \pm 3,9\%$ ), contudo, sem diferenças estatísticas em comparação com as células tratadas apenas com AA ( $45,0 \pm 8,4\%$ ).

### C2BBe1

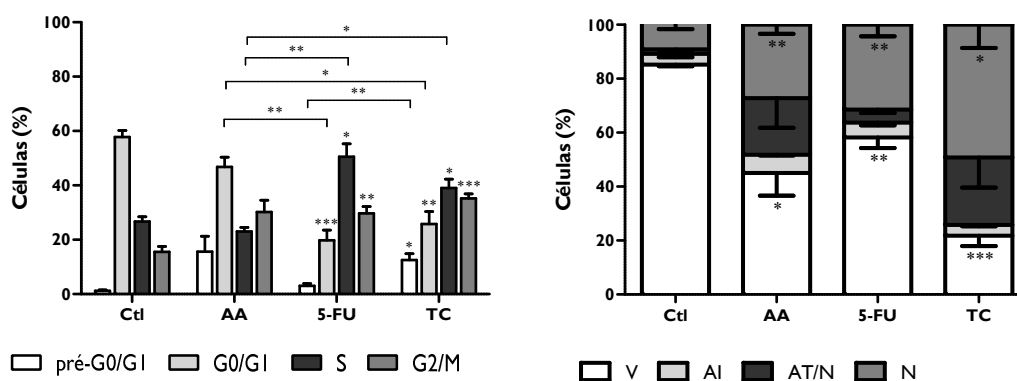


Figura 51: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células C2BBe1 após exposição ao AA, ao 5-FU ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Para a combinação com oxaliplatina nas células C2BBe1, usámos a concentração de AA de  $0,61 \text{ mM}$  e de Oxa de  $0,55 \text{ }\mu\text{M}$ . Na análise do ciclo celular destas células, evidenciada na Figura 52, a terapia de ácido ascórbico com oxaliplatina induziu um bloqueio em fase S ( $p = 0,002$  relativamente ao controlo) com diminuição da percentagem de células em fase G0/G1 ( $p = 0,005$  relativamente ao controlo). Com a mesma



combinação, a viabilidade celular diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) de  $83,0 \pm 3,0\%$  no controlo para  $38,0 \pm 3,5\%$  nas células tratadas com a terapia combinada, com consequente aumento significativo ( $p = 0,002$ ) da morte celular de  $17,0 \pm 3,0\%$  para  $62,0 \pm 3,5\%$ . A percentagem de células vivas, obtida com a combinação de fármacos, foi também estatisticamente inferior à obtida com os tratamentos apenas com AA ( $51,7 \pm 2,7\%$ ;  $p = 0,048$ ) ou apenas com Oxa ( $66,2 \pm 4,3\%$ ;  $p = 0,003$ ), tornando-a a combinação mais promissora nesta linha celular. A morte celular após terapia combinada foi essencialmente por apoptose tardia/necrose, tendo-se obtido o valor percentual de  $23,2 \pm 3,9\%$ , estatisticamente superior ao obtido nas células controlo ( $5,2 \pm 1,1\%$ ;  $p = 0,019$ ) e nas células tratadas apenas com Oxa ( $6,0 \pm 1,0\%$ ;  $p = 0,024$ ).

### C2BBe1

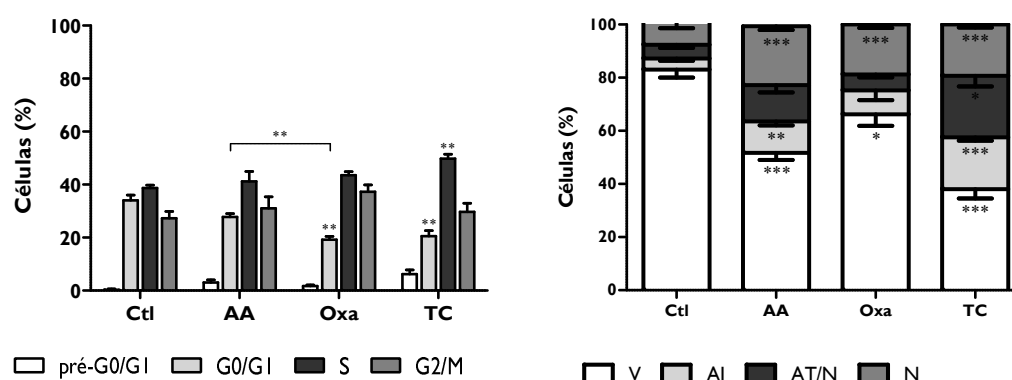


Figura 52: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células C2BBe1 após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Para a combinação de ácido ascórbico e irinotecano nas células C2BBe1, usámos a concentração de AA de  $1,23 \text{ mM}$  e de Iri de  $5,93 \text{ }\mu\text{M}$ . A análise do ciclo celular revelou que, apesar das diferenças estatísticas entre condições apresentadas no gráfico da esquerda da Figura 53, não se verificaram alterações estatisticamente significativas entre as células controlo e as células tratadas com a combinação de AA e de Iri, excetuando a diminuição da percentagem de células na fase G0/G1 ( $p = 0,047$ ). Salienta-se ainda que

a terapia combinada induziu o aumento da população celular na fase G2/M relativamente à mesma população tratada apenas com AA ( $p=0,011$ ). Quanto ao estudo da viabilidade celular, observou-se que, após o tratamento combinado de ácido ascórbico com Iri, a população de células viáveis foi  $22,7\pm 3,0\%$ , equiparada à obtida para o AA ( $23,0\pm 2,9\%$ ), apesar das diferenças estatísticas relativamente ao controlo ( $85,3\pm 3,7\%$ ;  $p<0,001$ ) e ao tratamento com Iri em monoterapia ( $70,0\pm 2,9\%$ ;  $p<0,001$ ). Paralelamente, verificou-se um aumento percentual, estatisticamente significativo ( $p=0,002$ ), das células C2BBel em morte, que passaram de  $14,7\pm 3,7\%$  no controlo para  $77,3\pm 3,0\%$  na terapia combinada. Das diversas vias de morte, salientamos a apoptose inicial que atinge  $9,0\pm 0,6\%$  na terapia combinada, apenas com diferenças em relação ao controlo ( $3,7\pm 0,4\%$ ;  $p<0,001$ ) e ao tratamento com Iri ( $4,7\pm 0,3\%$ ;  $p=0,002$ ), e da população de células em apoptose tardia/necrose que atinge  $45,0\pm 2,8\%$  na terapia combinada, com  $p<0,001$  em relação ao controlo ( $3,3\pm 1,0\%$ ) e ao tratamento com Iri ( $8,5\pm 1,4\%$ ). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a TC e o tratamento com AA em monoterapia.

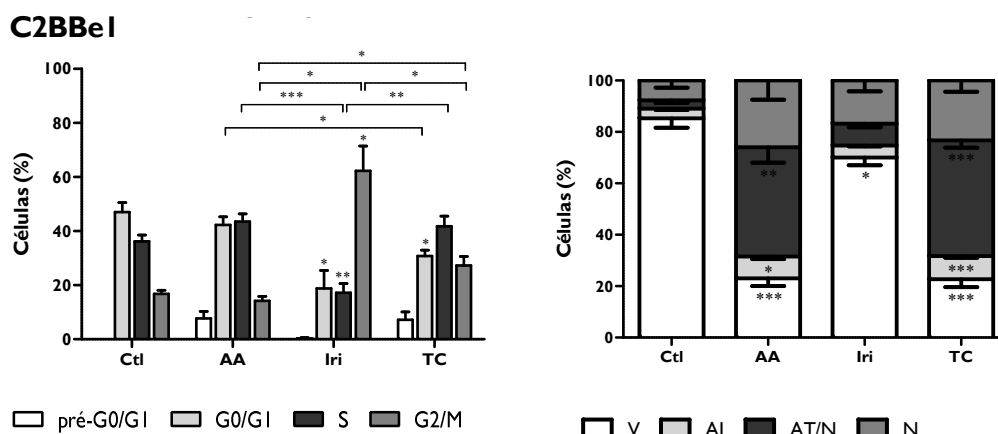


Figura 53: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células C2BBel após exposição ao AA, ao Iri ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes na sua maioria em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

A Figura 54 apresenta os resultados da terapia combinada de ácido ascórbico

com 5-FU e respetivos tratamentos em monoterapia nas células LS1034. Para esta combinação, usámos a concentração de AA de 8,05 mM e de 5-FU de 3,35  $\mu$ M. A nível do ciclo celular, as diferenças mais notórias presenciaram-se nas células tratadas com 5-FU em monoterapia, com um bloqueio na fase S ( $p < 0,001$ ). No entanto, esta alteração do ciclo celular não se repercutiu na terapia combinada. Com a combinação de AA e 5-FU, à semelhança da terapia com AA, verificou-se a presença do pico apoptótico ( $p = 0,011$ ). Em termos da viabilidade celular, a combinação de ácido ascórbico com 5-FU induziu uma diminuição para  $18,5 \pm 2,4\%$ , estatisticamente significativa em relação ao controlo ( $83,8 \pm 0,6\%$ ;  $p < 0,001$ ) e ao tratamento com 5-FU ( $59,5 \pm 4,7\%$ ;  $p < 0,001$ ). Consequentemente, verificou-se o aumento significativo ( $p = 0,002$ ) da morte celular de  $16,2 \pm 0,6\%$  no controlo para  $81,5 \pm 2,4\%$  na terapia combinada. Dos diferentes tipos de morte induzidos pela terapia combinada, destaca-se a população celular que morre por necrose ( $49,2 \pm 8,6\%$ ), estatisticamente superior à observada nas células controlo ( $9,2 \pm 1,7\%$ ;  $p < 0,001$ ) e nas células tratadas apenas com 5-FU ( $31,5 \pm 4,3\%$ ;  $p < 0,001$ ). Contudo, não houve diferenças estatísticas entre a terapia combinada e a monoterapia com AA.

### LS1034

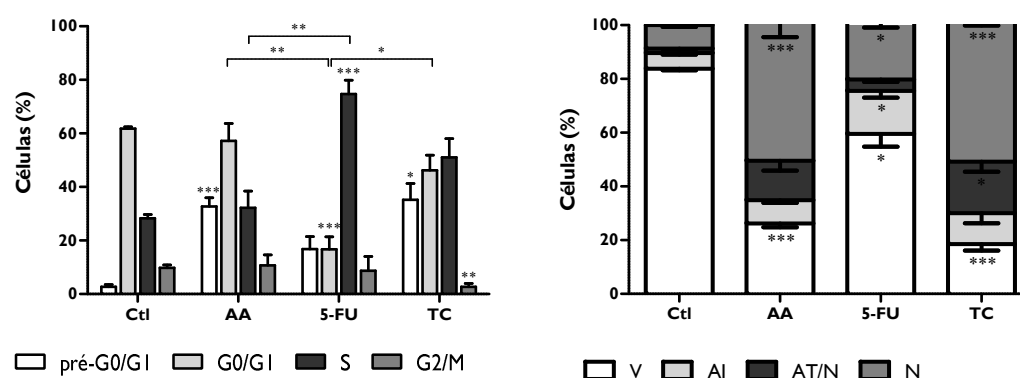


Figura 54: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células LS1034 após exposição ao AA, ao 5-FU ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Para a combinação de ácido ascórbico e oxaliplatina nas células LS1034, usámos a concentração de AA de 4,03 mM e de Oxa de 0,5 µM. Analisando os resultados obtidos (Figura 55) verifica-se que esta combinação de fármacos induziu o bloqueio do ciclo em fase S, com significado estatístico em relação ao controlo ( $p < 0,001$ ) e ao tratamento com AA ( $p < 0,001$ ) em monoterapia. Com o mesmo tratamento, a viabilidade celular reduziu aproximadamente para metade ( $45,5 \pm 1,3\%$ ), valor percentual inferior ao obtido nas células controlo ( $82,0 \pm 1,9\%$ ;  $p < 0,001$ ), nas células tratadas apenas com AA ( $58,8 \pm 4,6\%$ ) e nas células tratadas apenas com Oxa ( $57,0 \pm 2,2\%$ ;  $p = 0,009$ ). Esta redução foi acompanhada pelo aumento significativo ( $p = 0,002$ ) da morte celular, de  $18,0 \pm 1,9\%$  no controlo para  $54,5 \pm 1,3\%$  na terapia combinada, sem predominância de qualquer um dos tipos de morte celular e sem diferenças estatísticas em relação ao controlo e aos tratamentos em monoterapia.

### LS1034

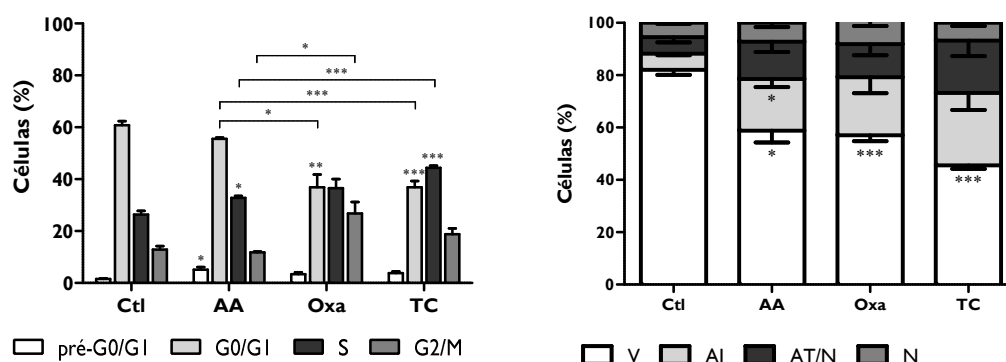


Figura 55: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células LS1034 após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Para a combinação de ácido ascórbico com irinotecano nas células LS1034, usámos a concentração de AA de 4,03 mM e de Iri de 1,19 µM. Os resultados evidenciados na Figura 56 indicam que o tratamento combinado induziu um bloqueio do ciclo celular na fase S, com  $p = 0,039$  em relação ao controlo e  $p = 0,004$  em relação ao

tratamento com Iri em monoterapia. De referir ainda a presença do pico apoptótico com significado estatístico em relação ao controlo ( $p=0,030$ ) e ao tratamento com Iri ( $p=0,035$ ). A terapia combinada de ácido ascórbico com irinotecano induziu a redução da viabilidade das células LS1034 para  $27,2\pm 3,5\%$ , sendo esta inferior à do controlo ( $82,0\pm 2,1\%$ ;  $p<0,001$ ), do tratamento isolado com AA ( $38,5\pm 2,5\%$ ) e do tratamento isolado com Iri ( $70,0\pm 1,1\%$ ;  $p<0,001$ ). Observou-se um aumento significativo ( $p=0,002$ ) da percentagem de células mortas na terapia combinada onde apresentaram o valor de  $18,0\pm 2,1\%$ , comparativamente com o controlo onde apresentaram o valor de  $72,8\pm 3,5\%$ . Comparativamente às células tratadas com Iri em monoterapia, a combinação de AA com Iri provocou o aumento significativo da população celular em apoptose inicial, de  $11,8\pm 1,9\%$  para  $29,5\pm 3,8\%$  ( $p=0,015$ ), da população celular em apoptose tardia/necrose, de  $10,3\pm 2,1\%$  para  $30,7\pm 5,4\%$  ( $p=0,041$ ), e da população celular em necrose, de  $6,2\pm 1,4\%$  para  $12,7\pm 1,4\%$  ( $p=0,027$ ). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a combinação de AA com Iri e a monoterapia com AA.

### LS1034

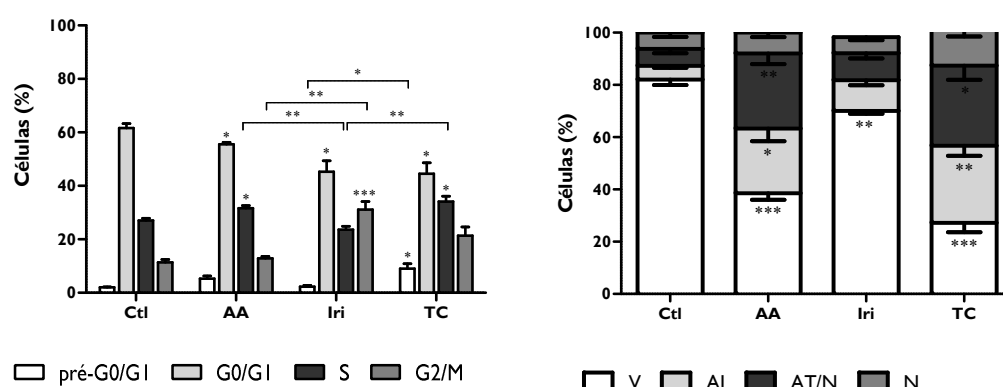


Figura 56: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células LS1034 após exposição ao AA, ao Iri ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

Para a terapia de combinação do ácido ascórbico com 5-FU nas células WiDr,

usámos a concentração de AA de 8,86 mM e de 5-FU de 1,41  $\mu$ M. Os resultados apresentam-se na Figura 57. A nível do ciclo celular a terapia combinada de AA com 5-FU induziu o bloqueio do ciclo celular em fase S ( $p=0,004$  relativamente ao controlo). Evidencia-se também a presença do pico apoptótico, com  $p=0,021$  em relação ao controlo e  $p=0,020$  em relação ao tratamento com 5-FU, pico observado também nas células tratadas com AA. O mesmo tratamento combinado de ácido ascórbico com 5-FU reduziu a viabilidade celular para  $6,5\pm 1,3\%$ , sendo esta inferior à obtida nas células controlo ( $89,2\pm 0,7\%$ ;  $p<0,001$ ), nas células tratadas com AA ( $9,2\pm 0,8\%$ ) ou 5-FU ( $65,2\pm 3,0\%$ ;  $p<0,001$ ) em monoterapia. Consequentemente, observou-se o aumento significativo ( $p=0,002$ ) da morte celular, de  $10,8\pm 0,7\%$  no controlo para  $93,5\pm 1,3\%$  na terapia combinada. Com esta terapia verificou-se a predominância de células em apoptose tardia/necrose, cujo valor de  $44,3\pm 9,2\%$  foi estatisticamente superior ao obtido nas células controlo ( $1,5\pm 0,3\%$ ;  $p=0,020$ ) e nas células tratadas apenas com 5-FU ( $5,3\pm 1,3\%$ ;  $p=0,029$ ), e de células em necrose ( $42,5\pm 7,5\%$ ), cuja percentagem foi estatisticamente superior à das células controlo ( $p=0,018$ ). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a combinação de AA com 5-FU e a monoterapia com AA.

**WiDr**

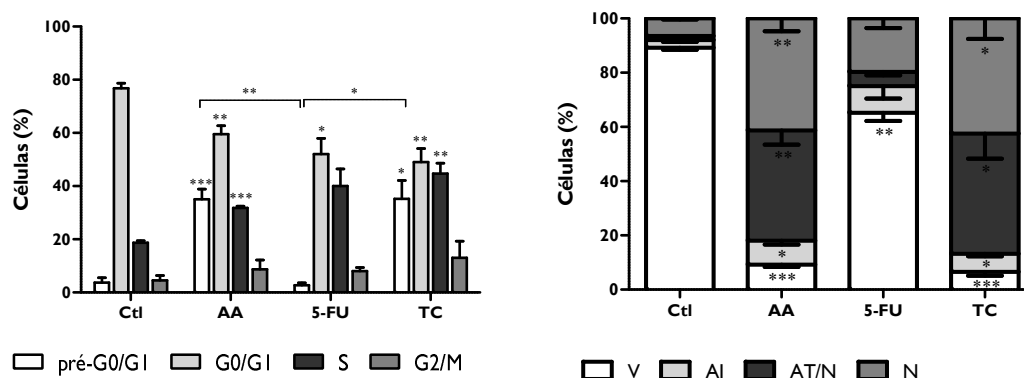


Figura 57: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células WiDr após exposição ao AA, ao 5-FU ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

Para a terapia combinada de ácido ascórbico com oxaliplatina nas células WiDr, usámos a concentração de AA de 4,43 mM e de Oxa de 2,05  $\mu$ M. De acordo com os resultados apresentados na Figura 58, verifica-se que a terapia combinada induziu o bloqueio do ciclo celular em fase S ( $p < 0,001$ ) em relação às células controlo e às células tratadas com Oxa em monoterapia. A análise da viabilidade e da morte celulares mostrou que a terapia combinada de ácido ascórbico com Oxa induziu uma diminuição da população de células viáveis para  $35,0 \pm 7,0\%$ , valor percentual inferior ao obtido nas células controlo ( $89,3 \pm 1,7\%$ ;  $p < 0,001$ ), nas células tratadas apenas com AA ( $60,7 \pm 6,5\%$ ) e nas células tratadas apenas com Oxa ( $77,7 \pm 3,4\%$ ;  $p < 0,001$ ). Complementarmente, observou-se o aumento significativo ( $p = 0,004$ ) da percentagem de células mortas na terapia combinada, onde apresentaram o valor de  $65,0 \pm 7,0\%$ , comparativamente com o controlo, onde apresentaram o valor de  $10,7 \pm 1,7\%$ . Da população de células mortas destacamos a predominância de células em apoptose tardia/necrose após terapia combinada, cujo valor de  $40,8 \pm 6,4\%$  foi estatisticamente superior ao obtido nas células controlo ( $2,8 \pm 0,5\%$ ;  $p = 0,007$ ) e nas células tratadas apenas com Oxa ( $6,5 \pm 1,4\%$ ;  $p = 0,010$ ). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a combinação de AA com Oxa e a monoterapia com AA nas células WiDr.

### WiDr

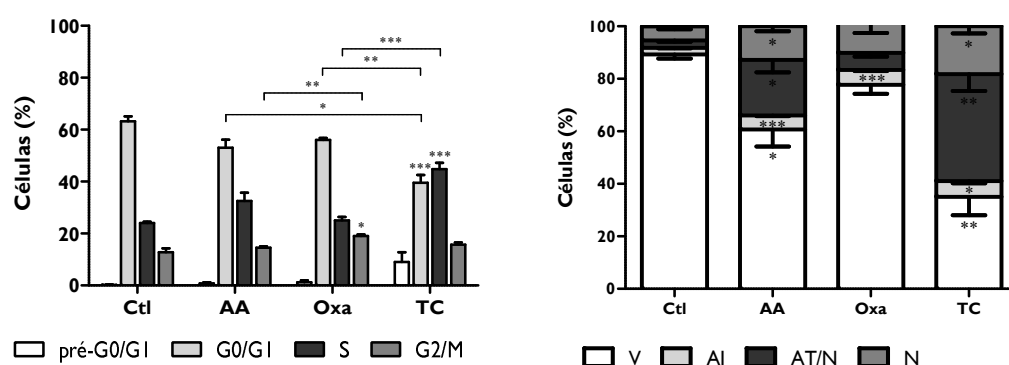


Figura 58: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células WiDr após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Por fim, para a combinação de ácido ascórbico com irinotecano nas células WiDr, usámos a concentração de AA de 6,64 mM e de Iri de 0,66  $\mu$ M. A análise da Figura 59 mostra que o tratamento combinado induziu o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, com significado estatístico em relação ao controlo ( $p=0,005$ ) e em relação ao AA ( $p=0,039$ ). Paralelamente, esta combinação reduziu a viabilidade celular para metade ( $51,5\pm 6,1\%$ ), sendo este valor percentual inferior ao obtido nas células controlo ( $85,5\pm 1,4\%$ ;  $p=0,008$ ), nas células tratadas apenas com AA ( $59,0\pm 5,8\%$ ) e nas células tratadas apenas com Iri ( $78,7\pm 1,8\%$ ;  $p=0,021$ ). Paralelamente, verificou-se o aumento significativo ( $p=0,002$ ) da morte celular, de  $14,5\pm 1,4\%$  no controlo para  $48,5\pm 6,1\%$  na terapia combinada. A morte celular induzida pela terapia combinada foi essencialmente por apoptose tardia/necrose ( $23,7\pm 2,0\%$ ), com diferenças estatísticas relativamente às células controlo ( $3,5\pm 1,0\%$ ;  $p<0,001$ ) e às células tratadas apenas com Iri ( $7,3\pm 1,7\%$ ;  $p<0,001$ ). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a combinação de AA com Iri e a monoterapia com AA.

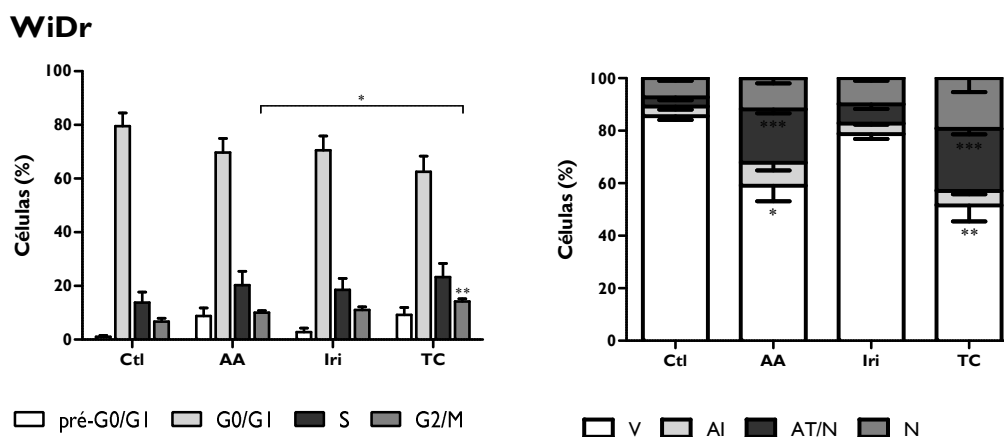


Figura 59: Ciclo celular (à esquerda), viabilidade e tipos de morte celular induzidos (à direita) nas células WiDr após exposição ao AA, ao Iri ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados do ciclo celular estão representados em percentagem (%) de células no pico pré-G0/G1 e nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, e os da viabilidade celular em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados exprimem a média e o erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$ , \*\* significa  $p<0,01$  e \*\*\* significa  $p<0,001$ .

Os resultados obtidos a nível da proliferação, do ciclo e da viabilidade celulares



mostraram que a terapia combinada mais promissora em todas as linhas celulares em estudo é a combinação de ácido ascórbico com Oxa. Desta forma, os estudos que se seguiram foram unicamente realizados nesta condição, dando-se por terminados os estudos *in vitro* com o 5-FU e com o irinotecano.

Uma vez que a combinação de ácido ascórbico e oxaliplatina induziu morte celular essencialmente por apoptose, fomos estudar alguns dos mecanismos envolvidos. Para tal, foram avaliadas a expressão de BAX e de BCL-2, as alterações do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), e a expressão de caspase-9 e da proteína P53.

A Figura 60 evidencia o efeito da terapia combinada de ácido ascórbico com Oxa na razão BAX/BCL-2, denotando-se um aumento desta razão em todas as linhas celulares comparativamente ao controlo.

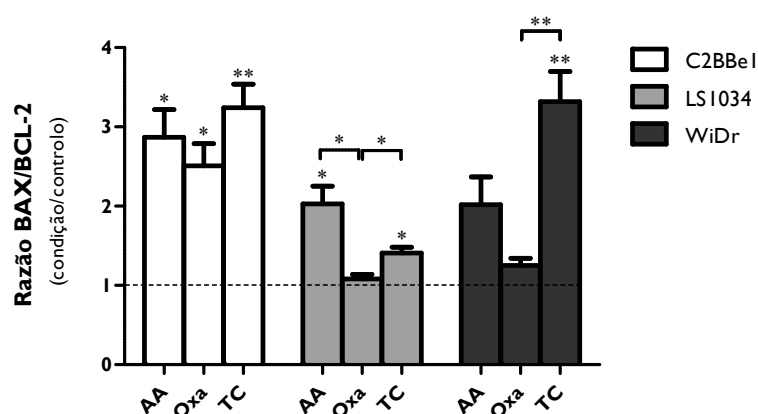


Figura 60: Expressão proteica de BAX e BCL-2 pelas células C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os níveis de expressão são expressos em razão BAX/BCL-2 normalizada ao controlo. Os resultados exprimem a média e o desvio-padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

Quando as células C2BBel foram tratadas com a terapia combinada, a razão BAX/BCL-2 foi  $3,2 \pm 0,3$  vezes superior à obtida nas células controlo ( $p = 0,006$ ). Este aumento significativo da razão BAX/BCL-2 após o tratamento combinado de AA com Oxa foi mais evidente que o observado nas condições de monoterapia, em que a razão BAX/BCL-2 foi  $2,9 \pm 0,4$  nas células tratadas apenas com AA (com  $p = 0,012$  relativamente

ao controlo) e  $2,5 \pm 0,3$  nas células tratadas apenas com Oxa (com  $p=0,011$  relativamente ao controlo). Nas células LSI034, comparativamente à condição controlo, verificou-se o aumento significativo desta razão quando estas foram tratadas com AA ( $2,0 \pm 0,2$ ;  $p=0,019$ ), o qual se repercutiu no tratamento com a terapia combinada ( $1,4 \pm 0,1$ ;  $p=0,011$ ). Consequentemente, quando as células foram tratadas apenas com Oxa, a razão BAX/BCL-2 foi inferior à obtida após tratamento apenas com AA ( $p=0,024$ ) ou com a TC ( $p=0,031$ ). Por fim, nas células WiDr sujeitas à terapia combinada, a razão BAX/BCL-2 foi  $3,3 \pm 0,4$  superior ( $p=0,007$ ) à obtida nas células controlo, com diferenças significativas também em relação às células tratadas apenas com Oxa ( $p=0,009$ ).

A Figura 61 evidencia as alterações induzidas pela terapia combinada e respetivas monoterapias no potencial de membrana mitocondrial, as quais foram dependentes da linha celular em estudo.

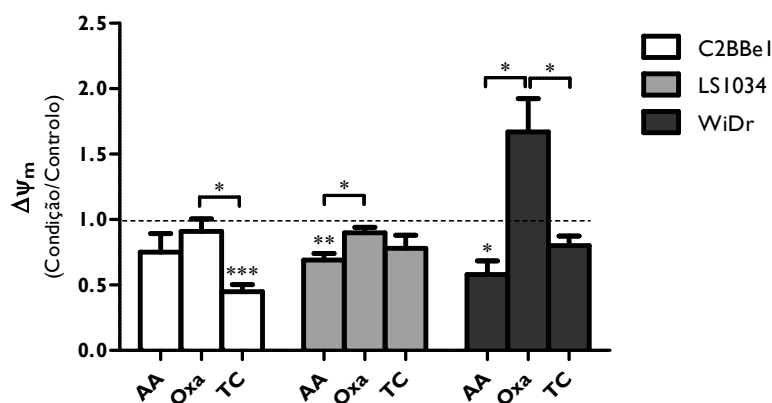


Figura 61: Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) das células C2BBe1, LSI034 e WiDr após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados estão representados como razão agregados/monómeros (A/M) para cada condição relativamente ao controlo. A diminuição da razão A/M está diretamente correlacionada com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Os dados exprimem a média e o desvio-padrão de, pelo menos, quatro experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

Nas células C2BBe1, comparativamente ao controlo, observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do  $\Delta\psi_m$  para metade ( $0,45 \pm 0,05$ ) após tratamento das células com a terapia combinada. Este facto corrobora os resultados anteriores, nos quais se observou a indução de apoptose. Na linha celular LSI034 apenas se observou

diminuição do  $\Delta\psi_m$  para  $0,78\pm 0,10$  ( $p<0,001$ ) quando estas células foram tratadas com AA, não se verificando diferenças estatisticamente significativas nas restantes condições. Nas células WiDr tratadas com AA em monoterapia observou-se a diminuição do  $\Delta\psi_m$  para  $0,58\pm 0,10$  ( $p=0,020$ ). Contrariamente, o tratamento com Oxa em monoterapia provocou o aumento do  $\Delta\psi_m$  para  $1,67\pm 0,25$ , com  $p=0,014$  em relação ao AA e  $p=0,044$  em relação à TC. A terapia combinada não provocou diferenças significativas no  $\Delta\psi_m$  nesta linha celular.

Os resultados do efeito da terapia combinada de ácido ascórbico com oxaliplatina, e de cada uma em monoterapia, na expressão de caspase-9 estão representados na Figura 62.

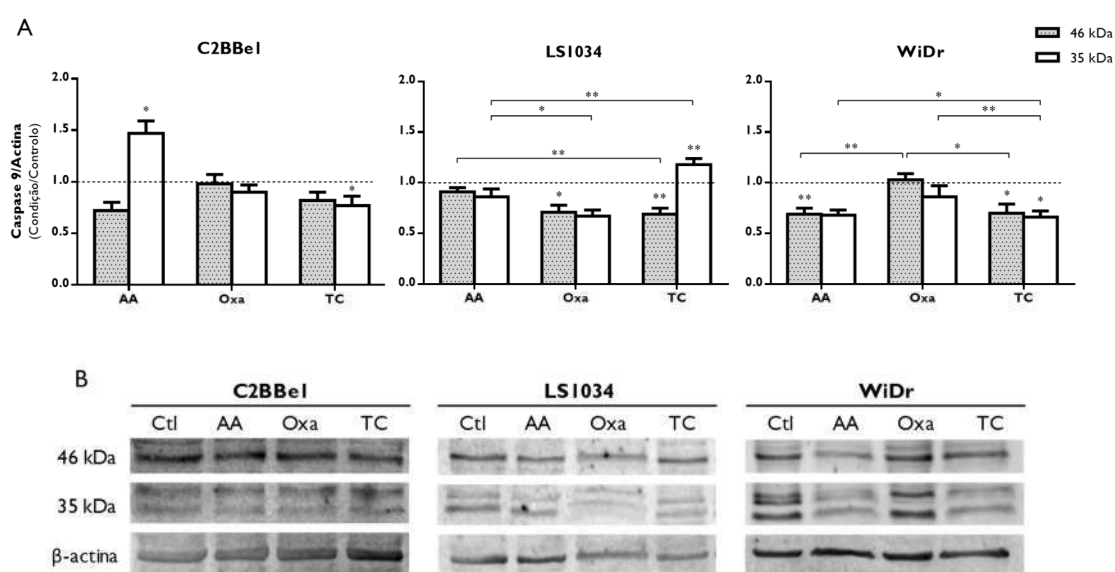


Figura 62: Expressão da caspase-9 pelas células C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. (A) O gráfico representa a expressão de caspase-9 (46 kDa) e de um produto de clivagem de peso molecular de 35 kDa. Os resultados estão sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência da caspase-9 e da  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo. Os resultados exprimem a média e erro padrão de, pelo menos, seis experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p<0,05$  e \*\* significa  $p<0,01$ . (B) A fotografia representa o *immunoblot* ilustrativo da expressão de caspase-9 (bandas de 46 kDa e de 35 kDa) e de  $\beta$ -actina para cada uma das linhas celulares e para cada condição experimental.

Nas células da linha celular C2BBel, denota-se que o tratamento com AA em monoterapia induziu o aumento significativo ( $p=0,041$ ) da proteína clivada de peso molecular de 35 kDa para  $1,47\pm 0,12$  em relação às células controlo. Em contraste, nas

células tratadas com a terapia combinada de AA com Oxa observou-se uma diminuição significativa ( $p=0,046$ ) da expressão da mesma proteína para  $0,77\pm 0,09$ , em relação ao controlo.

Quando as células LS1034 foram tratadas com a combinação de AA com Oxa, a expressão da pro-caspase-9 (proteína de 46 kDa) diminuiu para  $0,69\pm 0,06$  relativamente ao controlo ( $p=0,006$ ), com diferenças significativas também em relação às células tratadas apenas com AA ( $p=0,034$ ). Esta diminuição foi acompanhada pelo aumento da respetiva proteína clivada de 35 kDa para  $1,18\pm 0,06$ , com significância estatística relativamente às células controlo ( $p=0,010$ ) e às células tratadas apenas com AA ( $p=0,005$ ).

Quanto à linha celular WiDr, é de realçar que quando as células foram tratadas apenas com AA, se observou uma diminuição da pro-caspase-9 ( $0,69\pm 0,06$ ;  $p=0,005$ ) e da respetiva proteína clivada ( $0,68\pm 0,05$ ), em relação ao controlo. Com o tratamento combinado de AA com Oxa, a expressão da pro-caspase-9 diminuiu para  $0,70\pm 0,09$ , com  $p=0,037$  em comparação com o controlo e  $p=0,029$  em comparação com as células tratadas apenas com Oxa. De modo semelhante, as células tratadas com a combinação evidenciaram uma diminuição da proteína clivada para  $0,66\pm 0,06$ , diminuição estatisticamente significativa em relação às células controlo ( $p=0,012$ ), e em relação às células tratadas apenas com AA ( $p=0,017$ ) ou apenas com Oxa ( $p=0,009$ ).

A expressão de P53 após tratamento das células LS1034 e WiDr com a terapia combinada de AA com Oxa e em monoterapia encontra-se representada na Figura 63. De uma forma geral, verificou-se que tanto os tratamentos em monoterapia como o tratamento combinado causaram aumento da expressão de P53 em ambas as linhas celulares. No entanto, este aumento, apenas teve significado estatístico quando as células LS1034 ( $1,47\pm 0,10$ ;  $p=0,017$ ) e as células WiDr ( $1,82\pm 0,07$ ;  $p=0,001$ ) foram tratadas com Oxa em monoterapia. Devemos, porém, realçar que apesar de não se verificarem diferenças significativas com a combinação de AA com Oxa, nas células LS1034 verificou-se uma tendência para aumento da expressão de P53 ( $1,78\pm 0,29$ ) em relação às células tratadas apenas com AA ou com Oxa, enquanto nas células WiDr se observou

uma tendência para a diminuição ( $1,46 \pm 0,15$ ) também em relação às células tratadas apenas com AA ou com Oxa.

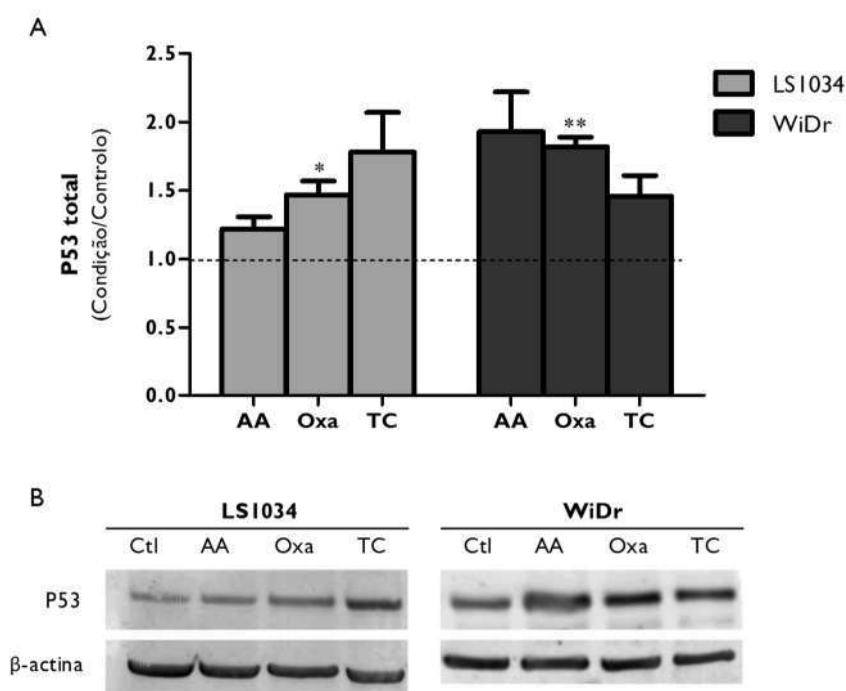


Figura 63: Expressão de P53 pelas células LS1034 e WiDr após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. (A) O gráfico representa a expressão de P53 total, pelas células LS1034 e WiDr, sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e de  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controle. Os resultados exprimem a média e erro padrão de, pelo menos, cinco experiências independentes. (B) A fotografia representa o *immunoblot* ilustrativo da expressão da P53 e da  $\beta$ -actina para cada uma das linhas celulares e para cada condição experimental. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

A análise da Figura 64 evidencia que qualquer dos tratamentos nas células C2BBel e nas células LS1034 não provocaram alterações na expressão de VEGF-R1. Por outro lado, quando as células WiDr foram tratadas com AA em monoterapia, registou-se um aumento de  $1,5 \pm 0,1$  em relação às células controlo ( $p = 0,003$ ), com diferenças também em relação às células tratadas apenas com Oxa ( $p = 0,002$ ). Esse aumento repercutiu-se no aumento de  $1,4 \pm 0,1$  observado nas células tratadas com a combinação de AA com Oxa, com diferenças em relação ao controlo ( $p = 0,029$ ) e às células tratadas apenas com Oxa ( $p = 0,041$ ).

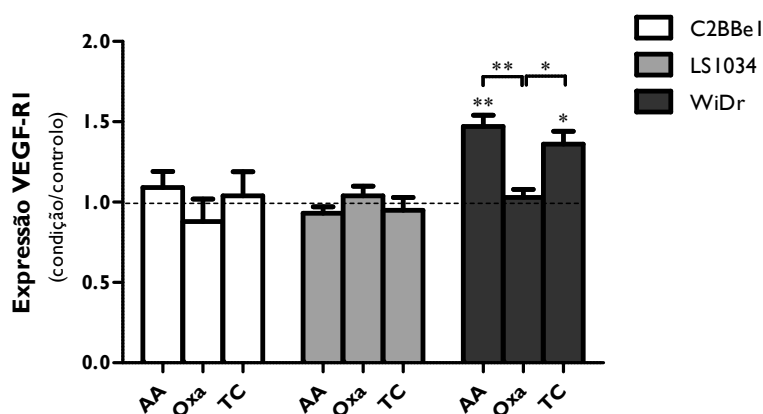


Figura 64: Expressão de VEGF-R1 pelas células C2BBel, LS1034 e WiDr após exposição ao AA, à Oxa ou à combinação de ambos (TC) durante 48 horas. Os resultados são expressos em relação ao controle e representam a média e o erro-padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

## Estudos *in vivo*

Na área da Oncologia, os estudos pré-clínicos constituem ferramentas imprescindíveis ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Os estudos *in vivo* representam uma primeira translação dos estudos *in vitro* para um microambiente multifatorial e, por conseguinte, mais complexo. Neste trabalho um modelo de xenotransplante heterotópico foi utilizado para averiguar o efeito do AA no crescimento e na agressividade tumoral, assim como, a eficácia na sensibilização do tumor aos agentes quimioterapêuticos convencionalmente usados e previamente estudados, nomeadamente, o 5-FU, a oxaliplatina e o irinotecano.

A primeira tarefa consistiu na obtenção do modelo animal de xenotransplante de adenocarcinoma colorretal em ratinhos atímicos Balb/c *nu/nu*, com recurso a células humanas da linha celular WiDr. Assim, foi possível obter um modelo animal reprodutível que permitiu a avaliação do efeito das diferentes terapêuticas estudadas. A população de animais xenotransplantados (50 animais) foi dividida em oito grupos: (I) grupo controlo,

não sujeito a qualquer tratamento (n=6); (II) grupo AA, sujeito a terapia apenas com AA (n=8); (III) grupo 5-FU, sujeito a terapia apenas com 5-FU (n=6); (IV) grupo AA+5-FU, sujeito à terapia combinada de AA e 5-FU (n=4); (V) grupo Oxa, sujeito a terapia apenas com Oxa (n=6); (VI) grupo AA+Oxa, sujeito à terapia combinada de AA e Oxa (n=6); (VII) grupo Iri, sujeito a terapia apenas com Iri (n=6); (VIII) grupo AA+Iri, sujeito à terapia combinada de AA e Iri (n=8). As figuras abaixo representam a inibição do crescimento tumoral após sujeição dos ratinhos a terapias com AA e/ou 5-FU (Figura 65), AA e/ou Oxa (Figura 66) e AA e/ou Iri (Figura 67). Nas figuras estão também representadas as curvas obtidas pela estimativa de *Kaplan-Meier*, nas quais o evento, ou ponto de corte, foi definido como o momento em que o volume tumoral relativo atingiu um valor igual ou superior a 2,5.

Comparando a curva de progressão tumoral dos animais controlo com a curva referente aos animais submetidos à terapia apenas com AA, verificou-se que o AA inibe o crescimento tumoral ( $p=0,015$ ). Ao final de 14 dias, a taxa de crescimento tumoral dos ratinhos controlo foi  $4,71 \pm 0,37$ , que é 1,5 vezes superior à obtida pelos ratinhos submetidos ao tratamento com ácido ascórbico ( $3,13 \pm 0,61$ ). Este facto é corroborado pelas curvas *Kaplan-Meier*, cuja análise mostra igualmente uma inibição do crescimento tumoral do grupo submetido ao tratamento com AA em comparação com o grupo controlo. As curvas relativas a estes dois grupos, evidenciadas na Figura 65, na Figura 66 e na Figura 67, indicam que no grupo controlo o tempo médio até ao evento correspondeu a 5 dias, enquanto no grupo submetido ao tratamento com AA, na concentração de 150 mg/kg, o tempo médio até ao evento foi de 7 dias.

A análise dos gráficos da Figura 65 mostra que a terapia combinada de AA com 5-FU apenas apresenta benefícios relativamente ao grupo controlo ( $p < 0,001$ ). Contudo, denotam-se as diferenças no tempo médio até ao evento. No grupo submetido à terapia com 5-FU o tempo médio até ao evento foi de 14 dias, enquanto no grupo sujeito à terapia combinada de AA com 5-FU esse valor não foi atingido durante o tempo que decorreu a experiência. Neste último caso, apenas 25% dos animais atingiram o evento aos 14 dias.

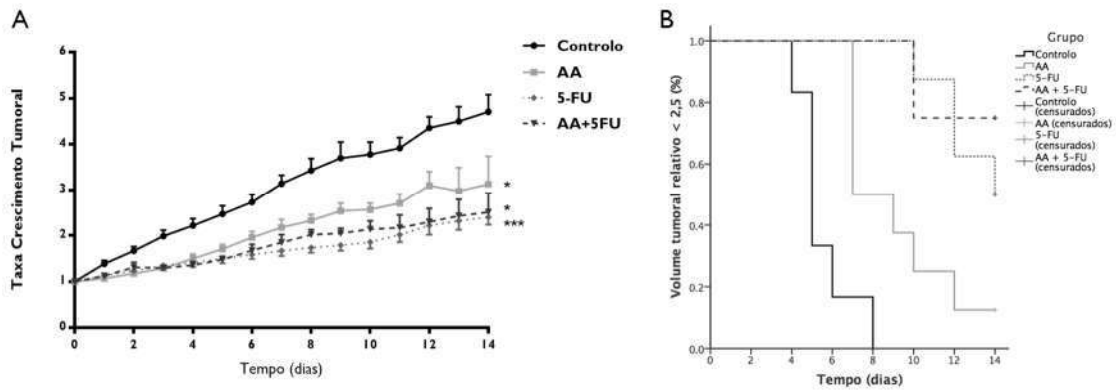


Figura 65: Inibição do crescimento tumoral de xenotransplantes da linha celular tumoral WiDr, após sujeição dos ratinhos ao tratamento com AA e/ou 5-FU. (A) Taxa de crescimento tumoral expressa como a média e o erro-padrão dos valores experimentais obtidos (4 a 8 animais por grupo). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ . (B) Curvas de Kaplan-Meier representam a probabilidade de o volume tumoral relativo aumentar 2,5 vezes relativamente ao volume tumoral inicial.

Os resultados representados na Figura 66 mostram uma inibição do crescimento tumoral no grupo sujeito à terapia combinada de AA com Oxa, em comparação com o grupo controlo ( $p=0,003$ ), e com os grupos tratados apenas com AA ( $p=0,010$ ) ou apenas com Oxa ( $p=0,010$ ). A análise das curvas Kaplan-Meier indicam que, no grupo sujeito apenas à terapia com Oxa, o tempo médio até ao evento foi de 13 dias. No entanto, quando sujeitos à terapia combinada de AA com Oxa durante os 14 dias, nenhum dos animais atingiu o evento, isto é, o volume tumoral relativo de 2,5.

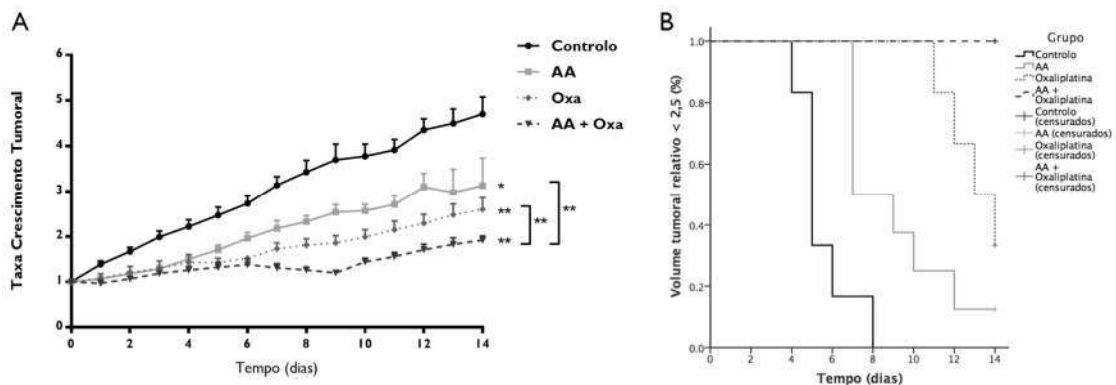


Figura 66: Inibição do crescimento tumoral de xenotransplantes da linha celular tumoral WiDr, após sujeição dos ratinhos ao tratamento com AA e/ou Oxa. (A) Taxa de crescimento tumoral expressa como a média e o erro-padrão dos valores experimentais obtidos (6 a 8 animais por grupo). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ . (B) Curvas de Kaplan-Meier que representam a probabilidade de o volume tumoral relativo aumentar 2,5 vezes relativamente ao volume tumoral inicial.



Por fim, com a terapia combinada de AA com Iri (Figura 67) verifica-se uma estagnação do volume tumoral, na medida em que o valor máximo de taxa de crescimento tumoral foi registado ao dia 14 e correspondeu a  $1,10 \pm 0,10$ . A progressão tumoral observada no grupo sujeito à terapia combinada de AA com Iri foi estatisticamente inferior à observada no grupo controlo ( $p < 0,001$ ) e no grupo sujeito à terapia apenas com AA ( $p = 0,002$ ). Pela análise das curvas *Kaplan-Meier* verifica-se que no final da terapia (após 14 dias), 67% dos animais submetidos à terapia com Iri não atingiram o volume tumoral relativo de 2,5. Decorrido o mesmo tempo, nenhum dos animais sujeito ao tratamento combinado de AA com Iri atingiu o evento.

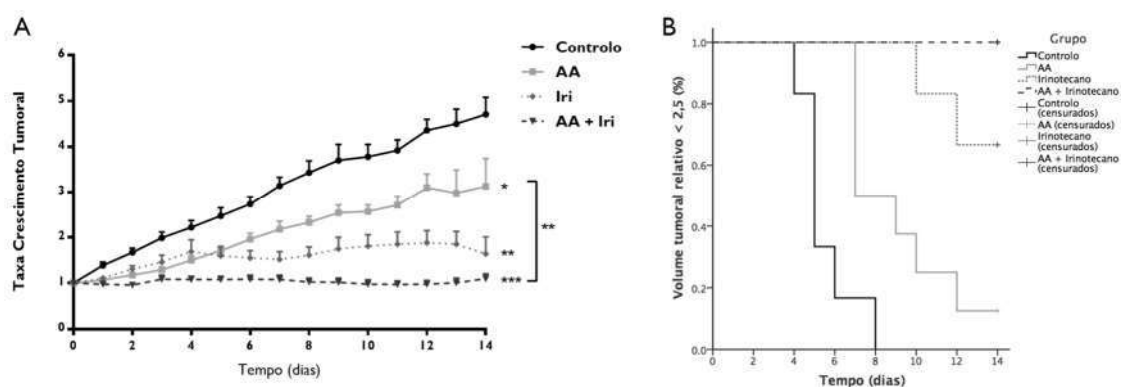


Figura 67: Inibição do crescimento tumoral de xenotransplantes da linha celular tumoral WiDr, após sujeição dos ratinhos ao tratamento com AA e/ou Iri. (A) Taxa de crescimento tumoral expressa como a média e o erro-padrão dos valores experimentais obtidos (6 a 8 animais por grupo). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com \*, em que \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\* significa  $p < 0,001$ . (B) Curvas de *Kaplan-Meier* que representam a probabilidade de o volume tumoral relativo aumentar 2,5 vezes relativamente ao volume tumoral inicial.

Os tumores excisados dos animais foram avaliados por imunohistoquímica para determinação da expressão de KI-67. As imagens histológicas representativas de cada condição experimental mostram-se na Figura 68, na Figura 69, na Figura 70 e na Figura 71. A análise da marcação com KI-67 permitiu a obtenção dos valores percentuais de índice proliferativo descritos na Tabela 14. É importante referir que estes dados são apenas indicativos, na medida em que apenas foi possível analisar uma ou duas amostras de cada grupo experimental.

Tabela 14: Índice proliferativo avaliado por imunohistoquímica, com base na expressão do marcador de proliferação KI-67.

<b>Expressão (%)</b>	<b>Controlo</b>	<b>AA</b>	<b>5-FU</b>	<b>AA + 5-FU</b>	<b>Oxa</b>	<b>AA + Oxa</b>	<b>Iri</b>	<b>AA + Iri</b>
KI-67	56,9	44,6	58,0	31,5	71,3	54,8	23,9	42,1

A expressão de KI-67 é apresentada em termos percentuais e é referente a cada um dos grupos experimentais, cujos cortes histológicos estão evidenciados na Figura 68, na Figura 69, na Figura 70 e na Figura 71.

Na Figura 68 estão evidenciados os cortes histológicos referentes ao grupo controlo e ao grupo sujeito à terapia com AA. Comparando o valor percentual associado à respetiva marcação do KI-67 destes dois grupos experimentais, comprovou-se a diminuição do índice proliferativo nos tumores tratados com AA (44,6%) em comparação com os tumores do grupo controlo (56,9%).

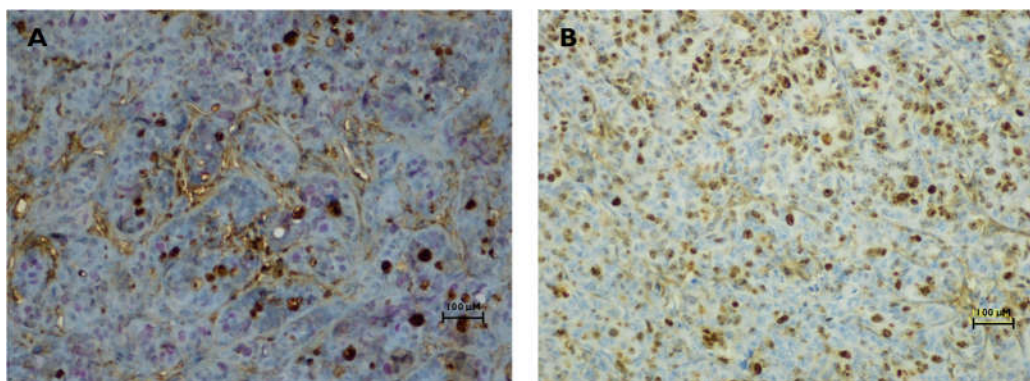


Figura 68: Imagens dos cortes histológicos após imunohistoquímica para avaliação da expressão de KI-67. (A) representa a condição controlo e (B) a condição de tratamento com AA. As imagens A e B foram obtidas com a ampliação de 200x.

A comparação das imagens da Figura 69 evidencia a diminuição da marcação de KI-67 na presença de AA, com diminuição do índice proliferativo de 58,0%, obtido no tumor tratado com 5-FU em monoterapia, para 31,5%, obtido no tumor tratado com a terapia combinada de AA com 5-FU.

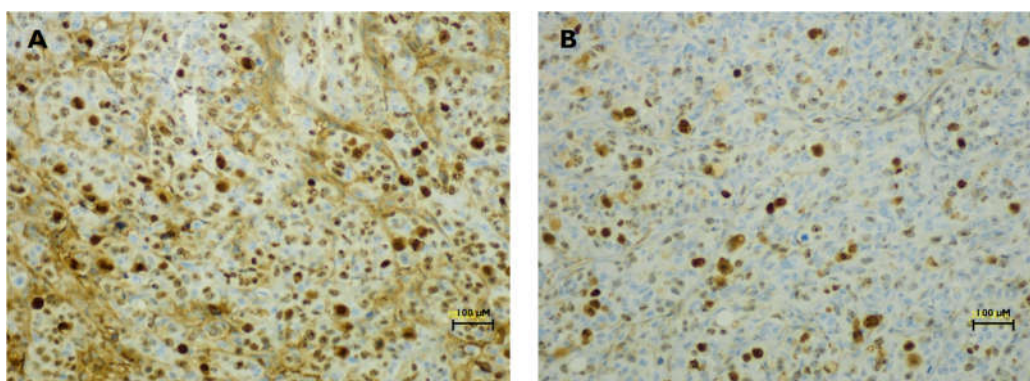


Figura 69: Imagens dos cortes histológicos após imunohistoquímica para avaliação da expressão de KI-67. (A) representa a condição de tratamento com 5-FU isoladamente e (B) a condição de tratamento com a combinação de AA com 5-FU. As imagens A e B foram obtidas com a ampliação de 200x.

Analisando a Figura 70, verifica-se igualmente que o corte histológico referente à terapia combinada de ácido ascórbico com Oxa apresenta menor marcação de KI-67 em comparação com o corte histológico referente à terapia apenas com Oxa. Este facto repercutiu-se na diminuição do índice proliferativo de 71,3%, obtido no grupo submetido à terapia apenas com Oxa, para 54,8%, obtido no grupo sujeito à terapia combinada de AA com Oxa.

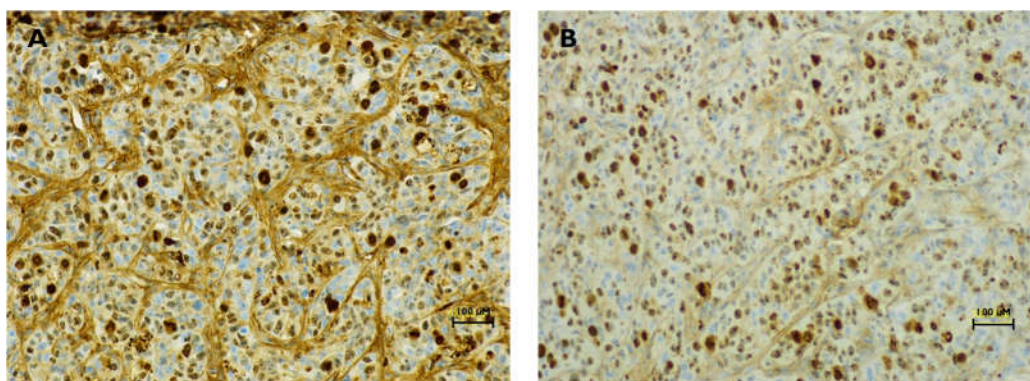


Figura 70: Imagens dos cortes histológicos após imunohistoquímica para avaliação da expressão de KI-67. (A) representa a condição de tratamento com Oxa isoladamente e (B) a condição de tratamento com a combinação de AA com Oxa. As imagens A e B foram obtidas com a ampliação de 200x.

A análise das imagens da Figura 71 evidencia menor expressão de KI-67 no tumor tratado apenas com Iri, com índice proliferativo de 23,9%, em comparação com o tumor tratado com a terapia combinada de AA com Iri, com índice proliferativo igual a 42,1%.

É de salientar que em todos os grupos sujeitos à terapia com AA, quer seja isoladamente ou em combinação, o índice proliferativo foi sempre inferior ao do grupo controlo.

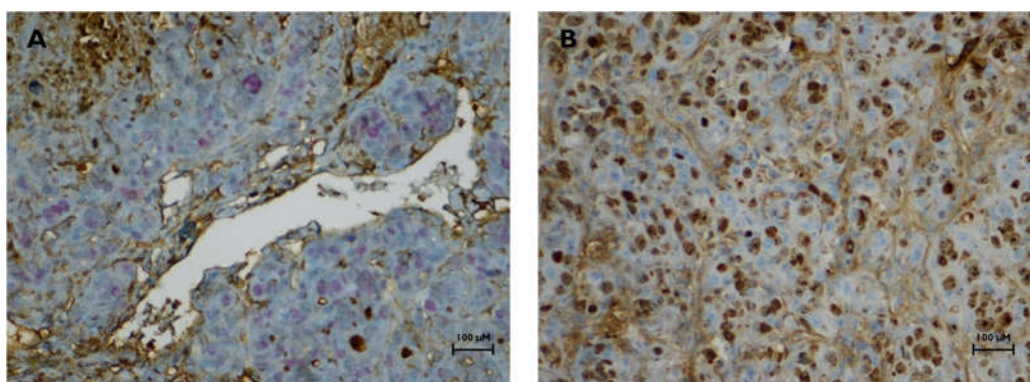


Figura 71: Imagens dos cortes histológicos após imunohistoquímica para avaliação da expressão de KI-67. (A) representa a condição de tratamento com Iri isoladamente e (B) a condição de tratamento com a combinação de AA com Iri. As imagens A e B foram obtidas com a ampliação de 200x.

## DISCUSSÃO

A vitamina C tem sido estudada *in vitro* e *in vivo* em combinação com inúmeros fármacos citotóxicos, embora com opiniões controversas relativamente à sua eficácia (Wilson *et al*, 2014). No entanto, as preocupações iniciais de que o ascorbato poderia reduzir a eficácia dos tratamentos de radioterapia ou de quimioterapia convencionais ainda não foram demonstradas. Vários estudos *in vitro* sugerem antes que o ascorbato, em concentrações farmacológicas, poderá aumentar a eficácia destes tratamentos (Du *et al*, 2012). O efeito quimiossensibilizante da vitamina C foi já comprovado por diversos autores em vários tipos de cancro, nomeadamente em combinação com a doxorrubicina, a cisplatina, o paclitaxel, o etoposido, ou o 5-fluorouracilo para o tratamento do cancro

da mama (Kurbacher *et al*, 1996; Verrax & Calderon, 2009) e na redução significativa dos efeitos secundários associados à doença e aos tratamentos de quimioterapia e de radioterapia em doentes com o mesmo tipo de cancro (Vollbracht *et al*, 2011); em combinação com a gencitabina para o tratamento do cancro do pâncreas (Espey *et al*, 2011); em combinação com a cisplatina numa linha celular de cancro colorretal (An *et al*, 2011); e em combinação com a carboplatina e com o paclitaxel na inibição tumoral em modelos animais de cancro do ovário e na redução da toxicidade associada à quimioterapia em doentes com esta neoplasia (Ma *et al*, 2014). Desta forma, tem sido mostrado que o ascorbato, administrado em concentrações farmacológicas por via intravenosa, poderá não só potenciar os efeitos da quimioterapia convencional, como também melhorar a qualidade de vida dos doentes oncológicos (Du *et al*, 2012).

Considerando que a reduzida sensibilidade à quimioterapia continua a ser um dos maiores obstáculos no tratamento eficaz do cancro colorretal (Gonzalez-Pons & Cruz-Correa, 2015), com este trabalho pretendeu-se estudar o potencial de uma nova abordagem terapêutica eficaz contra esta neoplasia e com diminuídos efeitos secundários para o doente. Esta abordagem baseou-se no estudo da combinação de concentrações elevadas de ácido ascórbico com concentrações reduzidas de fármacos utilizados convencionalmente em doentes com cancro colorretal, elegíveis para regimes de quimioterapia de primeira e de segunda linha. A avaliação da potencial sinergia entre o ácido ascórbico e o 5-fluorouracilo (5-FU), a oxaliplatina ou o irinotecano foi feita numa primeira fase com recurso a estudos *in vitro* e, posteriormente, com recurso a estudos *in vivo*.

## **Estudos *in vitro***

O primeiro parâmetro dos estudos *in vitro* a ser avaliado foi a proliferação celular utilizando o ensaio SRB. Após tratamento das células C2BBel, LSI034 e WiDr com concentrações crescentes de AA, de 5-FU, de oxaliplatina ou de irinotecano obtiveram-se curvas dose-resposta que permitiram o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub>,

relativos a cada um dos compostos, para cada linha celular. Tendo por base os valores de  $IC_{50}$  obtidos em monoterapia, aplicou-se o modelo de combinação de fármacos de *Straetemans* e seus coautores (*Straetemans et al*, 2005), cujo desenho experimental se baseia num esquema de raios. Considerando que o objetivo do trabalho foi estudar a eficácia anti-tumoral da combinação de elevadas concentrações de ácido ascórbico com reduzidas concentrações de fármaco quimioterapêutico convencional, o esquema de combinação incluiu o uso de ambos os compostos na mesma proporção ( $f=0,5$ ) e o uso do AA em maior proporção que o fármaco em estudo ( $f=0,75$ ). Ambos os regimes de combinação foram relativos aos valores de  $IC_{50}$  obtidos às 96 horas para cada composto individualmente.

O 5-FU é amplamente usado no tratamento do cancro. Durante os últimos anos têm sido feitos avanços no conhecimento do mecanismo de ação deste fármaco, o que tem levado ao desenvolvimento de novas estratégias que têm permitido melhorar a sua atividade anti-tumoral (*Longley et al*, 2003). Porém, sabe-se que, quando administrado em concentrações padrão, a aplicabilidade clínica do 5-FU é moderada e que, de uma forma geral, a massa a administrar é limitada pelo seu perfil de segurança, pois a mielossupressão e a toxicidade gastrointestinal são os principais efeitos secundários subjacentes ao seu uso (*Saif et al*, 2009).

Os resultados obtidos com o 5-FU em monoterapia na linha celular C2BBel não permitiram a determinação dos valores de  $IC_{50}$  para os tempos de exposição mais curtos (24 e 48 horas de incubação), o que significa que a máxima concentração de 5-FU testada (480  $\mu$ M) não foi capaz de diminuir a proliferação celular para além de 50%. Após 72 e 96 horas de exposição, o 5-FU assumiu valores de  $IC_{50}$  iguais a 58,1  $\mu$ M e a 20,1  $\mu$ M, respetivamente. O efeito do 5-FU na linha celular C2BBel foi assim dependente da concentração de fármaco e do tempo de incubação. Quando combinado com o ácido ascórbico obtivemos um  $IC_{50}$  do 5-FU menor e dependente do tempo de incubação e do regime de combinação. Deste modo, às 48 horas o  $IC_{50}$  do 5-FU tornou-se passível de ser determinado, assumindo valores de 18,1  $\mu$ M com igual proporção ( $f=0,5$ ) de ambos os fármacos e de 6,9  $\mu$ M com o AA em maior proporção ( $f=0,75$ ). A mesma resposta foi observada às 72 e 96 horas, na medida em que com o AA em maior



proporção foi obtido um menor valor de  $IC_{50}$  para o 5-FU. A determinação do índice de combinação permitiu ainda aferir a existência ou não de sinergia entre os dois compostos. Desta forma, verificou-se que tanto a concentração de AA como o tempo de incubação desempenham um papel fundamental na existência de sinergia. Quando o AA e o 5-FU estiveram na mesma proporção apenas houve sinergia após 96 horas de incubação. Quando o AA esteve em maior proporção, observou-se a existência de efeito aditivo às 72 horas e de efeito sinérgico às 96 horas. Um estudo realizado por Frömberg e seus coautores mostrou também que as concentrações de AA constituem um fator preponderante para o estabelecimento de efeitos sinérgicos ou antagônicos quando o AA é combinado com um fármaco citostático (Frömberg *et al*, 2011).

Após tratamento das células LS1034 com 5-FU em monoterapia, obtiveram-se valores de  $IC_{50}$  iguais a 238,0  $\mu$ M após 48 horas de incubação, a 15,4  $\mu$ M após 72 horas de incubação e a 6,7  $\mu$ M após 96 horas de incubação. Tal como na linha celular C2BBel, o efeito do 5-FU nas células LS1034 foi dependente da concentração de fármaco e do tempo de incubação. Na presença de ácido ascórbico, o  $IC_{50}$  do 5-FU diminuiu de forma dependente do tempo de incubação e do regime de combinação, de modo que, quanto maior o tempo de incubação menor o  $IC_{50}$  do 5-FU, assim como, quanto maior a proporção de AA menor o  $IC_{50}$  do 5-FU. Analisando os valores dos índices de combinação, observou-se a existência de sinergia para a condição de  $f=0,75$  às 72 horas e para ambos os regimes de combinação às 96 horas. Assim, podemos concluir que o AA aumentou a sensibilidade da linha celular LS1034 ao 5-FU, na medida em que na presença de elevadas concentrações de AA, a concentração de 5-FU necessária para inibir a proliferação celular em 50% é cerca de 8 vezes inferior aquela que é necessária para a obtenção do mesmo efeito na ausência de AA. Uma das principais características desta linha celular é a sua resistência multifármacos, intimamente relacionada com a sobre-expressão de PGP (Abrantes *et al*, 2014). Resultados obtidos no capítulo anterior mostraram que quanto maior a concentração de ácido ascórbico, maior o efeito citotóxico induzido nesta linha celular. Contudo, o aumento da concentração de ácido ascórbico não interferiu na expressão de PGP, o que permite concluir que o AA não é substrato da PGP. De igual modo, vários autores reportaram já que o 5-FU também não é substrato da PGP (Takara *et al*, 2002; Frömberg *et al*, 2011). Assim, a combinação do

AA com o 5-FU poderá constituir uma vantagem no tratamento de tumores resistentes, visto que a grande maioria dos tumores resistentes a múltiplos fármacos está associada à sobre-expressão de PGP (Frömberg *et al*, 2011).

Nas células WiDr verificamos igualmente que o 5-FU em monoterapia inibiu a proliferação celular de forma dependente da concentração e do tempo de incubação, de modo que o 5-FU assumiu valores de  $IC_{50}$  decrescentes com o aumento do tempo de incubação. À semelhança das outras duas linhas celulares, observamos também que a presença de ácido ascórbico induziu uma diminuição do valor de  $IC_{50}$  do 5-FU adstrita à concentração de AA e ao tempo de incubação. Esta diminuição do valor de  $IC_{50}$  do 5-FU traduziu-se em sinergia entre os dois compostos após 96 horas de exposição.

De uma forma geral, observamos que concentrações elevadas de AA sensibilizaram as células das três linhas celulares em estudo ao efeito do 5-FU. Apesar da presença de ácido ascórbico ter induzido uma diminuição do  $IC_{50}$  do 5-FU, este efeito foi mais notório na condição em que o AA estava em maior proporção que o 5-FU e para os tempos de incubação mais longos, condição em que os dois compostos atuaram sinergicamente. Estudos anteriores realizados em linhas celulares de carcinoma da mama mostraram também que o ascorbato foi capaz de melhorar a atividade de vários fármacos quimioterapêuticos, entre os quais, o 5-FU. Os autores postularam a hipótese do ascorbato poder desempenhar um papel importante na modulação do stresse oxidativo (Verrax & Calderon, 2009), parâmetro que se sabe ser crítico na resposta a tratamentos anti-tumorais (Kuppusamy *et al*, 2002). Abdel-Latif e seus coautores estudaram em maior detalhe outra via que poderá estar implicada no mecanismo de sinergia entre o ácido ascórbico e o 5-FU. A combinação de ambos não só potenciou o efeito citotóxico individual do 5-FU em células de carcinoma do esófago, como também inibiu a translocação do NF- $\kappa$ B (do inglês *nuclear transcription factor kappa B*) e do AP-1 (do inglês *activator protein 1*), fatores de transcrição implicados na patogénese da resistência a fármacos (Abdel-Latif *et al*, 2005).

A oxaliplatina é um derivado de platina, de estrutura base semelhante à da cisplatina e que foi sintetizado com o intuito de dar resposta à elevada toxicidade associada à cisplatina (Kline & El-Deiry, 2013). A oxaliplatina tem como principal alvo



molecular o DNA, onde forma ligações cruzadas e previne a replicação e a transcrição do mesmo, conduzindo a célula à morte celular (Perego & Robert, 2016). Os principais efeitos secundários associados à oxaliplatina incluem as náuseas, a neurotoxicidade e a mielossupressão. A neurotoxicidade está associada essencialmente a neuropatia periférica com reduzida nefrotoxicidade e ototoxicidade (Chabner & Longo, 2010).

A associação do ácido ascórbico com a oxaliplatina mostrou resultados bastante promissores nas células das três linhas celulares em estudo. No que concerne à linha celular C2BBel, verificámos que a oxaliplatina em monoterapia induziu a inibição da proliferação celular de forma dependente da concentração de fármaco e do tempo de incubação. O efeito da oxaliplatina foi potenciado pela presença de ácido ascórbico, sendo mais evidente na presença de maiores concentrações de AA ( $f=0,75$ ). Este efeito evidenciou-se logo após 24 horas de exposição, condição para a qual a combinação resultou na diminuição do valor do  $IC_{50}$  da oxaliplatina em cerca de 200 vezes, comparado com o valor do  $IC_{50}$  obtido em monoterapia. Para além disso, os valores de índice de combinação comprovaram a existência de sinergia entre os dois compostos para todas as condições de associação testadas. Os resultados obtidos no capítulo anterior mostraram que o mecanismo de ação do ácido ascórbico na linha celular C2BBel passa pelo aumento do stresse oxidativo, parecendo envolver essencialmente moléculas como o radical superóxido e o peroxinitrito. O peroxinitrito é formado pela interação do radical superóxido com o óxido nítrico e tem como um dos principais alvos a molécula de DNA, na medida em que pode causar cisão das suas cadeias, promovendo a oxidação e a nitração dos fragmentos de DNA (Kiechle & Zhang, 2002; Hrabarova et al, 2011). Paralelamente, a oxaliplatina exerce a sua ação citotóxica pela ligação covalente às bases púricas da molécula de DNA, desregulando as suas funções normais (Chabner & Longo, 2010). A complementaridade de dois mecanismos de citotoxicidade no mesmo alvo, a molécula de DNA, poderá justificar o efeito sinérgico evidente observado entre o ácido ascórbico e a oxaliplatina nas células C2BBel.

O tratamento das células LS1034 com oxaliplatina em monoterapia induziu a inibição da proliferação celular com o aumento da concentração de fármaco e do tempo de incubação. Uma vez combinada com o AA, observou-se uma diminuição do valor do

IC<sub>50</sub> da oxaliplatina, comparativamente com a monoterapia, mais evidente ainda na condição em que as células foram tratadas com AA em maior proporção. A título de exemplo salientam-se os valores de IC<sub>50</sub> da oxaliplatina obtidos após 48 horas de exposição, correspondendo a 5,9 µM aquando do tratamento em monoterapia, com diminuição para 0,5 µM na presença de AA na mesma proporção que a oxaliplatina e para 0,4 µM na presença de AA em maior proporção. Além da diminuição do valor do IC<sub>50</sub> da oxaliplatina, estas condições de associação refletiram também a existência de sinergia entre a oxaliplatina e o AA. O efeito sinérgico foi igualmente verificado para os tempos mais longos, à exceção da condição de  $f=0,5$  às 72 horas. Yu-Lin Lin e seus coautores descreveram que a mutação no gene *KRAS* pode ser preditiva de maior sensibilidade à oxaliplatina. O estudo realizado por estes autores mostrou também que o mesmo não ocorreu com o 5-FU e com o irinotecano (Lin et al, 2012). Sabendo que as células da linha celular LS1034 possuem esta mutação (Lee et al, 2011), uma terapia de associação que envolva o uso de concentrações reduzidas de oxaliplatina e concentrações elevadas de AA aparenta ser promissora. Os resultados de sinergia obtidos sugerem inclusivamente que o perfil resistente desta linha celular, proveniente da sua capacidade de extrusão de fármacos (Casalta-Lopes et al, 2011), não afeta a eficácia do tratamento de combinação de ácido ascórbico com oxaliplatina.

À semelhança das células das outras duas linhas celulares, a resposta das células da linha celular WiDr ao tratamento com oxaliplatina em monoterapia foi dependente da concentração e do tempo de incubação. Nestas células, o valor de IC<sub>50</sub> não foi possível de determinar após 24 horas de tratamento, mas assumiu os valores de 21,0 µM para as 48 horas de incubação, de 10,9 µM para as 72 horas de incubação e de 8,2 µM para as 96 horas de incubação com oxaliplatina. Quando as células WiDr foram tratadas com AA e oxaliplatina em igual proporção ( $f=0,5$ ), o valor de IC<sub>50</sub> da oxaliplatina foi 7,7 µM às 24 horas e nos restantes tempos reduziu no mínimo 8 vezes relativamente à monoterapia. Na presença de AA em maior proporção que a oxaliplatina ( $f=0,75$ ) verificou-se que esta diminuição foi ainda mais acentuada. Estes factos demonstram que a presença de ácido ascórbico tem uma elevada preponderância no efeito combinado entre os compostos, traduzindo-se em efeito sinérgico para a maioria das condições, excetuando as 24 horas.

Apesar dos resultados obtidos no capítulo anterior mostrarem que o mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células das três linhas celulares foi diferente, a sua ação quimiossensibilizante da oxaliplatina foi evidente em todas elas. Foi igualmente verificado no Capítulo IV que nas células de todas as linhas celulares o ácido ascórbico induziu lesões a nível do DNA. Ambas as evidências apontam para que o sucesso desta sinergia reside no facto do principal alvo molecular de ambas as terapias ser a molécula de DNA. Lesões acrescidas no DNA, mediadas pela presença de ácido ascórbico, irão fragilizar a célula tumoral deixando-a mais suscetível às lesões induzidas pela oxaliplatina.

De entre os vários análogos de camptotecina, o irinotecano tem propriedades únicas pois é, primeiramente, convertido por enzimas carboxilesterases no seu metabolito ativo, o SN-38. Este, por sua vez, pensa-se ser o metabolito responsável pelos efeitos biológicos do irinotecano, tanto em termos de eficácia como em termos de efeitos secundários (Chabner & Longo, 2010). O mecanismo de citotoxicidade do SN-38 baseia-se na estabilização do complexo DNA-topoisomerase-I criado durante a replicação do DNA, impedindo a topoisomerase-I de desempenhar as suas funções na religação das cadeias de DNA (Wagner, 2015). Os principais efeitos adversos associados ao uso de irinotecano incluem efeitos imediatos como diarreia, cólicas abdominais, vômitos, rubor e sudorese. Para além disso, é também frequente a ocorrência de mielossupressão (predominantemente neutropenia), alopecia, náuseas, mucosite, fadiga, níveis elevados de transaminases hepáticas e, menos frequente, toxicidade pulmonar. A severidade da toxicidade induzida pelos regimes que incluem irinotecano poderá constituir um fator limitante da massa a administrar, sendo os casos mais frequentes associados a diarreia tardia e a neutropenia. A coocorrência destes dois sinais coloca os doentes em elevado risco de complicações (Chabner & Longo, 2010).

O tratamento das células C2BBel com irinotecano em monoterapia induziu a redução do valor de  $IC_{50}$  do irinotecano de forma dependente da concentração e do tempo de incubação, tendo sido obtidos os seguintes valores de 132,6  $\mu\text{M}$  às 48 horas, de 75,9  $\mu\text{M}$  às 72 horas e de 11,9  $\mu\text{M}$  às 96 horas de incubação. Weekes e seus coautores reportaram que, apesar da acumulação citoplasmática da P53 *wild type* ser um fator preditivo positivo para a resposta ao irinotecano, este fármaco é igualmente capaz de

induzir apoptose em células de carcinoma colorretal com P53 mutada ou ausente (Weekes *et al*, 2009). Este facto corrobora os resultados por nós obtidos, tendo em conta que, de acordo com os dados apresentados no Capítulo IV, as células C2BBe1 não expressam a proteína P53. Com a presença do ácido ascórbico verificámos a diminuição do valor de  $IC_{50}$  do irinotecano com o aumento do tempo de incubação e com o aumento da concentração de AA testada. Contudo, os dois compostos só atuaram sinergicamente na condição em que o AA estava presente em maior proporção ( $f=0,75$ ) e para o maior tempo de incubação. Desta forma, nesta linha celular não pareceu haver uma complementaridade evidente dos mecanismos de citotoxicidade do ácido ascórbico e do irinotecano que se traduzisse em efeito sinérgico.

Nas células LS1034 observou-se a inibição da proliferação celular em resposta ao tratamento isolado com irinotecano, dependente da concentração e do tempo de incubação, com valores de  $IC_{50}$  do irinotecano que variaram entre 83,4  $\mu\text{M}$  às 24 horas e 4,8  $\mu\text{M}$  às 96 horas de incubação. O tratamento combinado com o ácido ascórbico induziu uma diminuição abrupta do valor de  $IC_{50}$  do irinotecano, assumindo para a condição  $f=0,5$  o valor mínimo de 1,4  $\mu\text{M}$  às 48 horas e para a condição  $f=0,75$  o valor mínimo de 0,5  $\mu\text{M}$  às 48 e 96 às horas. A associação de AA com irinotecano na linha celular LS1034 traduziu-se em efeito sinérgico para ambos os regimes de combinação às 48 e às 96 horas e para o regime de combinação  $f=0,75$  às 72 horas. Este resultado é bastante promissor tendo em conta a resistência multifármacos desta linha celular associada à sobre-expressão da PGP (Casalta-Lopes *et al*, 2011). Ao contrário do fármaco anteriormente referido, oxaliplatina, tanto o irinotecano como o SN-38 são substratos desta proteína de efluxo (Jonsson *et al*, 2000; Sooryakumar *et al*, 2011), pelo que seria de esperar que a sua extrusão da célula pela PGP conferisse alguma resistência ao tratamento. Porém, não só se verificou um efeito anti-proliferativo com o tratamento com irinotecano em monoterapia, como ainda esse efeito foi potenciado pela presença de ácido ascórbico.

Por fim, relativamente às células da linha celular WiDr, verificámos igualmente uma dependência do tempo de incubação e da concentração em resposta ao tratamento com irinotecano. O tratamento combinado com o ácido ascórbico induziu uma

diminuição do valor de  $IC_{50}$  do irinotecano, de modo que, após 24 horas de tratamento, não foi possível determiná-lo na condição de monoterapia nem na condição de terapia combinada com AA em igual proporção ( $f=0,5$ ). No entanto, na presença de AA em maior proporção que o irinotecano ( $f=0,75$ ), o  $IC_{50}$  do irinotecano assumiu o valor de  $1,4 \mu\text{M}$ . Apesar da redução da concentração inibitória média do irinotecano, apenas se verificou a existência de sinergia na condição de  $f=0,75$  às 96 horas. Os resultados obtidos mostraram que o AA não potencia o efeito do irinotecano nas células da linha celular WiDr.

Tendo em conta as evidências de efeito sinérgico obtidas nas células da linha celular LS1034, e a ausência de sinergia nas linhas celulares C2BBel e WiDr na maioria das condições testadas, conclui-se que o possível mecanismo de sinergia é influenciado por características intrínsecas às linhas celulares. Tal como referido anteriormente, o irinotecano é convertido no seu metabolito ativo, SN-38, por carboxilesterases, enzimas com elevados níveis de atividade no fígado, mas também no duodeno, no jejuno, no íleo, no cólon e no reto. Assim, autores há que defendem que é provável que a conversão do irinotecano em SN-38 a nível do fígado e do trato gastrointestinal seja determinante na exposição do tumor ao SN-38 (Rothenberg, 2001). Um estudo realizado por Jonsson e seus coautores teve como objetivo avaliar o efeito de inibidores da topoisomerase-I, nomeadamente o topotecano, o irinotecano e o seu metabolito ativo SN-38, num painel de células de linhas celulares e de células tumorais primárias de doentes oncológicos. Os autores concluíram que os três compostos mostraram padrões de atividade semelhante nas células das linhas celulares, contudo, nas células das culturas primárias os efeitos obtidos diferiram. De realçar que, nas células primárias de cancro colorretal, apenas o irinotecano mostrou atividade anti-tumoral substancial (Jonsson *et al*, 2000). Desta forma, tanto os níveis de carboxilesterases intrínsecos às células das linhas celulares, como a limitação do modelo experimental *in vitro* associada à ausência destas enzimas provenientes dos tecidos normais humanos, poderão influenciar a resposta à terapia com irinotecano e, conseqüentemente, à terapia de combinação com o ácido ascórbico. Desta forma, é expectável que estudos *in vivo* reflitam com maior exatidão o potencial sinérgico desta combinação de compostos.

Estudos pré-clínicos anteriores realizados em modelos animais mostraram uma redução significativa do crescimento tumoral após tratamento com concentrações farmacológicas de ascorbato (Casciari *et al*, 2005; Chen *et al*, 2008a; Du *et al*, 2010), contudo, demonstraram também que o seu uso como agente citotóxico único não foi curativo (Frömberg *et al*, 2011). Nesse contexto, o nosso trabalho demonstrou o aumento da eficácia de três fármacos quimioterapêuticos convencionais pela associação com concentrações de ácido ascórbico na ordem dos mM. A diminuição do IC<sub>50</sub> de cada um destes fármacos constituiu um facto particularmente importante no âmbito do tratamento do cancro colorretal, tendo em conta que a toxicidade geral associada à inclusão dos mesmos nos regimes de tratamento é frequentemente um fator limitante da massa a administrar e a razão para a interrupção da quimioterapia.

Após a avaliação do efeito da combinação de AA com 5-FU, oxaliplatina ou irinotecano a nível da proliferação celular, pretendeu-se averiguar as alterações induzidas no ciclo celular. Paralelamente, examinou-se até que ponto o efeito inibitório da proliferação celular se traduziu também num efeito citotóxico, isto é, no aumento da morte celular.

Vários estudos realizados em linhas celulares tumorais demonstram que o 5-FU pode induzir a paragem do ciclo celular em fase S (Bowen *et al*, 2000; Yeh *et al*, 2000; Jordan & Stein, 2003). Este facto corrobora os resultados por nós obtidos nas células das linhas C2BBel e LS1034, relativamente à monoterapia com 5-FU. Na linha celular WiDr o mesmo não se verificou, possivelmente devido à mutação da proteína P53, que a impede de regular a P21, proteína fundamental para a regulação do ciclo celular (Wang *et al*, 2015b).

No que diz respeito ao tratamento combinado de ácido ascórbico com 5-FU, de uma forma geral, a resposta das células das três linhas celulares foi semelhante, pois as alterações observadas após o tratamento combinado foram muito idênticas às observadas com o AA em monoterapia. Nas células C2BBel, a terapia combinada de AA com 5-FU provocou o bloqueio do ciclo celular na fase S e na fase G2/M, justificando o efeito anti-proliferativo anteriormente observado. A deteção do pico apoptótico na terapia combinada poderá relacionar-se com o aumento da morte celular por apoptose

tardia/necrose, associado à diminuição da viabilidade celular como resposta ao tratamento combinado. Nas células LSI034, o bloqueio do ciclo celular na fase S após tratamento com 5-FU em monoterapia não se repetiu na terapia combinada, contrariamente ao aumento do pico apoptótico após monoterapia com AA que se verificou igualmente no tratamento combinado. De igual forma, verificou-se uma diminuição abrupta da viabilidade celular em resposta ao tratamento combinado, significativa em relação ao tratamento com 5-FU, mas sem diferenças relativamente ao tratamento com AA em monoterapia. Na linha celular WiDr, após o tratamento combinado destaca-se o bloqueio do ciclo celular em fase S e a presença do pico apoptótico, relacionado certamente com o aumento da percentagem de células em apoptose tardia/necrose que acompanhou a diminuição acentuada da viabilidade celular. Estas alterações foram muito semelhantes às observadas após tratamento com AA em monoterapia. De facto, o ácido ascórbico potenciou o efeito citotóxico do 5-FU, contudo, as diferenças entre a terapia combinada e o tratamento isolado com AA não foram significativas. Aparentemente, os resultados obtidos nas condições testadas devem-se, essencialmente, à presença de AA, não se observando uma complementaridade de ação entre os compostos. Tendo em conta que esta avaliação foi feita após 48 horas de incubação, os dados obtidos corroboram a ausência de efeito sinérgico anteriormente observado.

Há autores que defendem que a citotoxicidade induzida pela oxaliplatina não se relaciona com o ciclo celular (Mehmood, 2014), facto que foi igualmente observado no nosso estudo nas células C2BBel e LSI034, apesar de nesta última se ter verificado uma tendência para a acumulação das células em fase G2/M após tratamento com oxaliplatina. Outros autores demonstraram também que a oxaliplatina induz o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (Arango *et al*, 2004; Nannizzi *et al*, 2010), facto também por nós observado nas células WiDr. Por outro lado, estudos demonstram que a oxaliplatina é um indutor de apoptose (Faivre *et al*, 2003; Kim *et al*, 2014), facto que corrobora a presença de apoptose na condição de monoterapia, mas também a sua implicação no mecanismo de sinergia.

Contrariamente ao observado nos estudos de combinação com 5-FU, a resposta

das células ao tratamento combinado de ácido ascórbico com oxaliplatina foi notória e não dependente unicamente de um dos compostos. Nas células C2BBel, a terapia combinada induziu a paragem do ciclo celular na fase S. Paralelamente, a viabilidade celular diminuiu com diferenças estatisticamente significativas, tanto relativamente à oxaliplatina (redução de 28,2%) como ao ácido ascórbico (redução de 13,7%). Neste caso não se observou um tipo de morte celular predominante, registando-se a presença de células em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e em necrose. Nas células LSI034, é de realçar que a terapia combinada induziu o bloqueio do ciclo celular na fase S e a diminuição da viabilidade celular, com aumento da morte celular essencialmente por apoptose e por apoptose tardia/necrose. Nas células WiDr, destaca-se o bloqueio do ciclo celular na fase S como resposta ao tratamento combinado, porém ausente em ambas as terapêuticas em monoterapia. Para além disso, a combinação de AA com oxaliplatina diminuiu a viabilidade celular em relação à monoterapia com oxaliplatina (redução de 42,7%) e à monoterapia com AA (redução de 25,7%), com aumento da morte celular essencialmente por apoptose tardia/necrose. O efeito sinérgico obtido após 48 horas de tratamento combinado com AA e oxaliplatina foi comprovado pelos resultados supracitados.

O mecanismo de ação do irinotecano envolve a inibição da topoisomerase I, uma enzima nuclear que mantém e modula a estrutura do DNA. O SN-38 liga-se à topoisomerase-I e previne a união das quebras transitórias da cadeia de DNA durante o processo de replicação, resultando na formação de complexos clivados. Desta forma, a lesão na molécula de DNA ocorre durante a fase S do ciclo celular. A consequente ativação do *checkpoint* em resposta à lesão no DNA, causada durante a fase S, induz a paragem do ciclo celular na fase G2/M (Haug *et al*, 2008). O bloqueio do ciclo celular nesta fase G2/M após terapêutica com irinotecano em monoterapia, observado nas células C2BBel e LSI034 é, por isso, justificado pelo seu mecanismo de ação. Uma vez mais, nas células WiDr, a mutação no gene que codifica a proteína P53 poderá ser a responsável pela ausência de alterações no ciclo celular nesta condição.

O tratamento combinado de ácido ascórbico com irinotecano induziu um perfil de resposta a nível do ciclo e da viabilidade celulares dependente da linha celular. Nas



células da linha C2BBel, o irinotecano em monoterapia induziu a paragem do ciclo celular na fase G2/M, no entanto, na terapia combinada a presença de ácido ascórbico reverteu este efeito. Apesar da terapia combinada induzir a diminuição significativa da percentagem de células vivas, relativamente à terapia apenas com irinotecano, esta resposta foi muito idêntica à da terapia apenas com AA. Estes factos corroboram a ausência de efeito sinérgico nesta linha celular após 48 horas de incubação. Nas células da linha LS1034, a terapia combinada induziu a desregulação do ciclo celular, destacando-se o bloqueio na fase S e a presença do pico apoptótico. Este último relaciona-se com o aumento das populações em morte celular por apoptose e por apoptose tardia/necrose observada após o mesmo tratamento. Com o tratamento combinado verificou-se a diminuição da viabilidade celular em comparação com as terapias apenas com AA (redução de 11,5%) ou com irinotecano (redução de 43%). Estas diferenças comprovam o efeito sinérgico anteriormente demonstrado. Nas células WiDr, a terapia combinada induziu o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, não observado em nenhum dos tratamentos em monoterapia. Paralelamente, observámos o decréscimo da viabilidade celular relativamente ao irinotecano em monoterapia, mas com um perfil de resposta muito semelhante ao observado apenas com o AA, justificando a ausência de sinergia entre o irinotecano e o ácido ascórbico nesta linha celular após 48 horas.

Após o estudo do efeito da combinação do ácido ascórbico com os três fármacos convencionalmente integrantes dos regimes de quimioterapia para o tratamento do cancro colorretal, o 5-FU, a oxaliplatina e o irinotecano nas três linhas celulares, tornou-se evidente que os resultados mais promissores foram obtidos com a combinação de ácido ascórbico e oxaliplatina. Por esta razão, e tendo em conta que este facto foi transversal às três linhas celulares, os mecanismos de citotoxicidade envolvidos no tratamento combinado de AA e oxaliplatina foram estudados em maior detalhe.

Alguns autores apontam para que a oxaliplatina possa induzir lesões nos tumores por indução da apoptose através da oligomerização da BAX na mitocôndria e consequente libertação do citocromo C para o citoplasma (Arango *et al*, 2004; Kim *et al*, 2014). Por outro lado, os resultados por nós apresentados no Capítulo IV indicam

que o ácido ascórbico foi capaz de induzir morte celular por apoptose e por necrose, dependendo da linha celular e da concentração testada. Após evidências do aumento da morte celular por apoptose e/ou por apoptose tardia/necrose, em resposta ao tratamento combinado de AA com oxaliplatina, os mecanismos de morte celular foram estudados através da avaliação da expressão de BAX e de BCL-2, das alterações do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e da expressão de caspase-9, de P53 e de VEGF-R1. Com o intuito de perceber os mecanismos de morte celular envolvidos na sinergia observada entre o ácido ascórbico e a oxaliplatina nas células de cada linha celular, estes parâmetros serão discutidos por linha celular.

Nas células da linha C2BBel, os estudos de viabilidade celular mostraram que a terapia combinada induziu morte celular por apoptose e/ou necrose. Estes resultados podem estar relacionados com o aumento da expressão da proteína pro-apoptótica BAX, perceptível pelo aumento estatisticamente significativo da razão entre a proteína BAX e a proteína BCL-2 que, por sua vez, está associado à diminuição do  $\Delta\psi_m$  após o tratamento combinado. Estas alterações foram igualmente observadas nas terapias apenas com AA ou com oxaliplatina, sendo o seu efeito exacerbado quando os compostos foram administrados em associação. Relativamente à implicação da caspase-9 nos mecanismos de ação de ambos os compostos e da sua combinação, os resultados não são tão lineares. Isto é, no tratamento com AA a ativação da caspase-9 é evidente, com tendência para a diminuição da pro-caspase-9 (46 kDa) e aumento estatisticamente significativo da respetiva proteína clivada (35 kDa). O tratamento combinado induziu uma ligeira diminuição da proteína clivada da caspase-9, o que se poderá relacionar com a presença de necrose (Golstein & Kroemer, 2007). Contudo, esta diminuição pode também estar relacionada com um mecanismo de escape à apoptose por parte da célula tumoral, através da sobre-regulação transcripcional da proteína inibidora da apoptose, XIAP (do inglês, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Lopez & Tait, 2015; Baig et al, 2016). A proteína XIAP atua como inibidor estequiométrico das caspases, na medida em que inibe a caspase-3 e a caspase-7, por ligação ao seu local ativo, e inibe a caspase-9 prevenindo ou revertendo a sua dimerização. Esta ação inibitória pode ser antagonizada pelas proteínas mitocondriais

SMAC/DIABLO (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point*) e Omi/HtrA2 (do inglês *high temperature requirement protein A2*), libertadas durante o estímulo apoptótico simultaneamente à libertação do citocromo C (Parrish *et al*, 2013). Claramente, perante um estímulo apoptótico, a célula tumoral ativa mecanismos de defesa capazes de anular eficazmente a atividade das caspases (Lopez & Tait, 2015).

De qualquer forma, os resultados por nós obtidos indicam que nas células C2BBel, o ácido ascórbico e a oxaliplatina parecem atuar sinergicamente pela ativação da via intrínseca da apoptose. Para além de formar aductos no DNA, é conhecido que a oxaliplatina é um composto tiofílico capaz de produzir stresse oxidativo (Espey *et al*, 2011). Kopetz e seus coautores mostraram que a oxaliplatina induz o aumento de ROS intracelulares de forma dependente da concentração e da linha celular (Kopetz *et al*, 2010). No nosso estudo, o incremento da produção de ROS, mediado pela oxaliplatina e pelo ácido ascórbico, promove a translocação, a oligomerização e a inserção de proteínas, entre as quais a BAX, a nível da mitocôndria. Esta é seguida da despolarização da membrana mitocondrial e da libertação de proteínas pro-apoptóticas da mitocôndria, como parte da ativação de diferentes mecanismos de morte celular, como igualmente mostraram outros trabalhos (Orrenius *et al*, 2007). Promovido tanto pelo ácido ascórbico como pela oxaliplatina, o estímulo oxidativo mais intenso pode justificar a presença de morte celular por necrose (Valko *et al*, 2006). Para além de aumentar a produção de ROS, o mecanismo de ação da oxaliplatina consiste na formação de aductos no DNA que impedem a sua replicação e a transcrição, conduzindo a célula à morte celular (Nannizzi *et al*, 2010). Simultaneamente, os resultados anteriormente mostrados evidenciam que o ácido ascórbico medeia a formação de ROS capazes de lesar o DNA de forma irreparável. Chiu e seus coautores provaram que a oxaliplatina induz quebras nas duas cadeias da dupla cadeia de DNA de forma dependente, mas também independente, da proteína P53 (Chiu *et al*, 2009).

O efeito citotóxico da oxaliplatina nas células da linha C2BBel corroborou a ação da oxaliplatina de forma independente da P53. A ausência da proteína P53 pode explicar a maior suscetibilidade das células desta linha celular às lesões no DNA, tendo

em conta a inerente falha na regulação de processos celulares como o controlo do ciclo celular, a reparação do DNA e a transcrição. Apesar do recetor VEGF-R1 poder estar implicado no efeito citotóxico do AA e, conseqüentemente, da terapia combinada, não se verificaram alterações na expressão do mesmo. Desta forma conclui-se que, nas células da linha C2BBel, o ácido ascórbico e a oxaliplatina atuam de forma sinérgica por mecanismos de ação distintos, contudo, sobre o mesmo alvo molecular, a molécula de DNA.

Nas células LS1034, denotámos um aumento da apoptose após o tratamento com ambos os compostos em monoterapia, que se intensificou após o tratamento combinado. Contudo, uma análise cuidada dos resultados permite concluir que nesta linha celular o ácido ascórbico e a oxaliplatina ativam vias diferentes da apoptose. Concordante com os dados obtidos nas células desta linha celular apresentados no Capítulo IV, verifica-se que o AA induziu o aumento da razão BAX/BCL-2, seguido da despolarização da membrana mitocondrial evidenciada pela diminuição do seu potencial, passos que constituem a fase inicial da ativação da apoptose pela via intrínseca (Parrish *et al*, 2013). Provou-se também que o mecanismo de indução de apoptose pela via intrínseca pelo ácido ascórbico era independente de caspases, podendo estar implicada a proteína AIF, proteína mitocondrial indutora de apoptose (Kroemer *et al*, 2009; Nikolettópoulou *et al*, 2013). Este facto foi igualmente verificado no nosso estudo com o AA em monoterapia, pois não se verificaram alterações na expressão de caspase-9. De igual modo, nas células tratadas apenas com oxaliplatina não se registaram alterações na razão BAX/BCL-2, no  $\Delta\psi_m$ , nem na expressão de caspase-9. Apesar da diminuição da pro-caspase-9, essa não se refletiu no aumento da respetiva proteína clivada. Zanardelli e seus coautores demonstraram o aumento da atividade da caspase-8 e da expressão de BID como resposta ao tratamento com oxaliplatina, indicando a ativação da via extrínseca da apoptose (Zanardelli *et al*, 2015). Outros autores verificaram que a capacidade da oxaliplatina ativar a via extrínseca da apoptose numa linha celular de cancro colorretal foi altamente dependente da sobre-regulação transcripcional mediada pela proteína P53 (McDermott *et al*, 2005). Este facto corrobora os resultados por nós obtidos, nos quais a terapia apenas com oxaliplatina induziu nas células LS1034 um aumento estatisticamente significativo da proteína P53, que se repercutiu numa

tendência para o aumento após tratamento combinado com AA. Mais uma vez, a ausência de alterações a nível do recetor VEGF-R1 excluem a sua implicação no mecanismo de citotoxicidade em estudo.

Assim, nas células da linha LS1034, verificámos a existência de uma complementaridade de mecanismos de citotoxicidade do ácido ascórbico e da oxaliplatina que culminaram na morte celular por apoptose, quer seja pela ativação da via intrínseca (no caso do AA) ou da via extrínseca (no caso da oxaliplatina), mas que se reflete no tratamento combinado, no aumento da razão BAX/BCL-2, na tendência para diminuição do  $\Delta\psi_m$  e na ativação da caspase-9. As vias intrínseca e extrínseca da apoptose convergem nas caspases efetoras, nomeadamente a caspase-3, a caspase-6 e a caspase-7. A produção de tBID (do inglês *truncated BH3 interacting-domain death agonist*) pela caspase-8 na via extrínseca irá aumentar a ação das proteínas BAX e BAK intensificando a via intrínseca e magnificando a resposta apoptótica (Baig *et al*, 2016). Assim, fármacos com diferentes mecanismos de ação e de ativação das vias de morte constituem uma mais valia em regimes de combinação (Espey *et al*, 2011), visto que podem minimizar a resistência de células tumorais com origens e com padrões de diferenciação distintos.

Nas células da linha WiDr, os nossos resultados da viabilidade celular evidenciaram o aumento predominante da morte celular por apoptose tardia/necrose, em resposta ao tratamento combinado. Os resultados da terapia apenas com ácido ascórbico corroboram os factos discutidos no Capítulo IV, pois o stresse oxidativo intenso, gerado pela presença de AA, induziu o aumento das proteínas apoptóticas face às anti-apoptóticas e a despolarização da membrana mitocondrial. Esta disfunção mitocondrial ocorreu em tal escala que levou à depleção de ATP e, conseqüentemente, à inibição das caspases por falha de energia para a sua ativação. Este processo culminou maioritariamente em morte celular por necrose (Golstein & Kroemer, 2007; Choi *et al*, 2009; Nikolettou *et al*, 2013). O tratamento com oxaliplatina induziu uma diminuição da viabilidade celular de apenas 11,6% relativamente ao controlo, facto que se refletiu na ausência de alterações na razão BAX/BCL-2. De maneira interessante, quando as células WiDr foram sujeitas à oxaliplatina em monoterapia observou-se um

aumento do  $\Delta\psi_m$  concomitante com a hiperpolarização mitocondrial (Mamede *et al*, 2015). Vários outros autores defendem que a hiperpolarização mitocondrial ocorre de forma transitória e reversível antes da ativação da apoptose (Perl *et al*, 2004; Nagy *et al*, 2007). Em maior detalhe, a sua ocorrência foi demonstrada antes da ativação das caspases, da externalização da fosfatidilserina e da disrupção do  $\Delta\psi_m$  em células de leucemia induzidas à apoptose pela via dos recetores de morte (FAS) (Banki *et al*, 1999) ou pela ação do peróxido de hidrogénio (Puskas *et al*, 2000). A hiperpolarização mitocondrial precede, assim, a dilatação e a rutura da membrana mitocondrial externa e a libertação de fatores apoptogénicos para o citoplasma. Um possível mecanismo para a hiperpolarização mitocondrial é a oclusão do poro de transição da permeabilidade mitocondrial como resultado da falha na manutenção da troca ATP/ADP (adenosina trifosfato/adenosina difosfato) entre a mitocôndria e o citosol (Ly *et al*, 2003). Assim, denota-se que o tratamento isolado com oxaliplatina não evidencia a existência de morte celular, coexistindo com a ausência de alterações na razão BAX/BCL-2 e na expressão de caspase-9, contudo, um estímulo acrescido com a presença de AA foi suficiente para que o processo apoptótico e/ou necrótico fosse concluído. A terapia combinada de AA com oxaliplatina nas células WiDr evidenciou o aumento da razão BAX/BCL-2, a tendência para a diminuição do  $\Delta\psi_m$  e a inibição da caspase-9, factos que indicam a possível predominância de morte celular por apoptose.

Podemos ainda referir que o aumento significativo dos níveis de expressão da proteína P53 nas células da linha WiDr, em resposta ao tratamento com a oxaliplatina em monoterapia, pode contribuir para a apoptose induzida por este fármaco. Observámos igualmente uma tendência para o aumento dos níveis de P53 após o tratamento das células apenas com AA e com a terapia combinada. Sabe-se que a P53 está mutada em cerca de 50% dos tumores colorretais e que o estado mutado desta proteína supressora tumoral está implicado no aumento ou na diminuição da sensibilidade dos tumores a inúmeros fármacos quimioterapêuticos (Li *et al*, 2015; Perego & Robert, 2016). Arango e seus coautores mostraram que a apoptose induzida pela oxaliplatina está associada com a sobre-regulação dos níveis de expressão da P53, implicando-a na cascata apoptótica iniciada pela oxaliplatina. Estes autores estudaram

uma linha celular de carcinoma colorretal que expressava a P53 *wild-type*. Quando a indução de apoptose foi alargada a um painel de 30 linhas celulares (11 com expressão de P53 *wild-type* e 19 de P53 mutada), os autores concluíram que o facto da proteína P53 estar mutada não permitia prever a resposta apoptótica à oxaliplatina, sugerindo que a sensibilidade das linhas celulares à oxaliplatina é modulada por outros fatores (Arango *et al*, 2004). Além dos dados acima referidos por nós obtidos nas células submetidas à terapia combinada, observámos também o aumento do recetor VEGF-R1 aquando da monoterapia com AA. Os estudos apresentados no Capítulo IV mostraram a ausência de alterações neste recetor quando as células WiDr foram tratadas com AA durante 24 horas. Aparentemente, o aumento do tempo de exposição das células WiDr ao AA para 48 horas induziu o aumento deste recetor do VEGF. De facto, esta evidência contradiz os dados referenciados na literatura, na medida em que vários autores demonstraram que elevadas concentrações de AA inibem a transcrição e a expressão de VEGF (Pagé *et al*, 2008; Yeom *et al*, 2009; Kawada *et al*, 2013; Kuiper *et al*, 2014). No nosso trabalho, o parâmetro medido não foi a expressão do ligando VEGF mas sim do recetor VEGF-R1. Deste modo, sem o apoio da literatura torna-se impossível inferir relativamente à expressão de VEGF, tendo em conta que a sobre-expressão do recetor I deste ligando pode não se traduzir no aumento da expressão do ligando VEGF a nível intracelular.

Em suma, nas células da linha WiDr denota-se a elevada preponderância da presença do ácido ascórbico no efeito sinérgico de ambos os compostos, a qual se traduz na ativação do processo apoptótico e/ou necrótico. Este acontecimento é salientado pelo facto de o tratamento combinado seguir o mesmo perfil, nos diferentes parâmetros avaliados, que o observado no tratamento apenas com AA.

## **Estudos *in vivo***

Os modelos *in vitro* de cancro possuem vantagens notáveis como prova de conceito para a descoberta de mecanismos moleculares envolvidos numa terapêutica,

entre as quais, as condições altamente controladas, a homogeneidade da amostra e a reprodutibilidade. No entanto, possuem naturalmente limitações, das quais se destacam a seleção genotípica e fenotípica das células durante a sua adaptação às condições *in vitro*, a acumulação de mutações ao longo do tempo em cultura, a população homogénea de células, que constitui simultaneamente uma vantagem e uma desvantagem, e o isolamento das células do seu microambiente tumoral (Cekanova & Rathore, 2014).

O desenvolvimento de modelos animais capazes de recapitular a história natural da oncogénese e a resposta clínica dos tumores à terapêutica constitui um importante pré-requisito para a translação rápida de tratamentos anti-tumorais que se mostraram promissores em modelos *in vitro* para a prática clínica (Cekanova & Rathore, 2014).

A utilidade dos modelos *in vivo* de cancro depende do quanto estes replicam a doença humana, em termos de forma e de função. Idealmente um modelo animal deverá mostrar características histopatológicas semelhantes às do humano; progredir pelos mesmos estádios e causar os mesmos efeitos fisiopatológicos tanto loco-regionais como sistémicos; e envolver os mesmos genes e vias bioquímicas na iniciação e na progressão da doença. Para além disso, a resposta tumoral do modelo pré-clínico deverá refletir de forma estreita a resposta do tumor a uma terapia em particular e ser capaz de prever a eficácia terapêutica em ensaios clínicos humanos (Céspedes *et al*, 2006).

A introdução dos ratinhos atímicos na década de 60 do século XX foi seguida por excelentes possibilidades na investigação através de modelos animais de xenotransplantes. Entender estes modelos, aceitar as suas limitações e melhorar as suas características é importante e necessário para o desenvolvimento da investigação. Estes modelos permitem entender os mecanismos envolvidos na patogénese, mas também apoiam no desenvolvimento de terapias anti-tumorais (Kerbel, 2003; Priolli *et al*, 2012).

Por motivos de contingência temporal, neste trabalho recorreu-se unicamente ao modelo de xenotransplante heterotópico em ratinhos atímicos Balb/c *nu/nu*. Este modelo baseia-se na inoculação ectópica de células de uma linha celular tumoral num local de crescimento não-fisiológico. A sua utilidade prende-se com o facto de serem fáceis e rápidos para obtenção de um *screening* farmacológico, permitirem estabelecer



relações PK/PD (PK, do inglês *pharmacokinetics*, concentração vs. tempo; PD, do inglês *pharmacodynamics*, efeito vs. tempo) e estudar a eficácia anti-tumoral de um determinado composto. Como principais vantagens denota-se a reprodutibilidade, a eficácia em termos de custos e de tempo, a aplicabilidade a vários tipos celulares tumorais, e a avaliação da influência do microambiente e do sistema imunológico na resposta terapêutica, a qual é limitada no caso de utilização de ratinhos atímicos. Em contraste, uma correta análise dos resultados implica ter consciência das limitações deste modelo, nomeadamente, as limitadas semelhanças fenotípicas e histológicas com o tumor primário; as taxas de metastização muito reduzidas; e a falta do microambiente tumoral fisiológico (Ruggeri *et al*, 2014).

Desde a década de 80 do século XX que os estudos *in vivo* têm permitido avaliar a resposta de diversos tipos de tumores a concentrações farmacológicas de ácido ascórbico (Fujita *et al*, 1982) e ampliar o conhecimento relativamente aos possíveis mecanismos de ação envolvidos. No entanto, é reconhecido que apesar da vasta quantidade de dados pré-clínicos *in vitro* sobre os efeitos da vitamina C nas células tumorais, há poucos dados relativamente à atividade anti-tumoral de concentrações elevadas de vitamina C em tumores humanos xenotransplantados em ratinhos imunodeprimidos (Wilson *et al*, 2014).

Em 1982, Fujita e seus coautores avaliaram o efeito do ascorbato em combinação com a adriamicina em ratinhos e em cobaias inoculados com células de leucemia. Os autores verificaram que o ascorbato não alterou a atividade anti-tumoral da adriamicina, contudo, prolongou a vida dos animais, diminuiu os níveis de peróxidos lipídicos no soro e no fígado e preveniu a cardiomiopatia, presente nos animais que receberam unicamente adriamicina (Fujita *et al*, 1982). Posteriormente, o efeito de concentrações farmacológicas de AA foi avaliado em modelos animais de carcinoma do ovário (Chen *et al*, 2008a), de adenocarcinoma do pâncreas (Chen *et al*, 2008a, 2011; Du *et al*, 2010), de carcinoma hepatocelular (Verrax & Calderon, 2009), de mesotelioma (Takemura *et al*, 2010), de cancro da próstata (Pollard *et al*, 2010) e de adenocarcinoma colorretal (Mamede *et al*, 2012b). Em todos eles a vitamina C induziu a diminuição do crescimento tumoral ou o aumento da sensibilidade ao tratamento com a quimioterapia convencional,

melhorando a sua eficácia e a sobrevivência dos animais.

No nosso estudo, o modelo animal de xenotransplante de adenocarcinoma colorretal foi otimizado inoculando 7 milhões de células da linha celular WiDr no dorso de cada animal. Inicialmente, o pretendido era estabelecer o modelo animal para cada linha celular utilizada nos estudos *in vitro*, contudo, mesmo após o recurso a várias abordagens experimentais, não foi possível obter um modelo animal otimizado e reprodutível com as células das linhas C2BBel e LS1034.

A avaliação do efeito do AA *in vivo* incluiu dois tipos de estudos, em monoterapia e em terapia combinada com o 5-FU, com a oxaliplatina (Oxa) ou com o irinotecano (Iri). Para tal, estabeleceram-se oito grupos de animais de acordo com o regime de tratamento a que foram sujeitos: grupo controlo, grupo AA, grupo 5-FU, grupo AA+5-FU, grupo Oxa, grupo AA+Oxa, grupo Iri e grupo AA+Iri.

A comparação do grupo controlo com o grupo AA, sujeito a injeções intraperitoneais diárias de AA na concentração de 150 mg/kg, evidenciou uma inibição do crescimento tumoral no grupo tratado com AA. Em estudos *in vivo* realizados por outros autores para avaliar o efeito da vitamina C no crescimento tumoral, as concentrações utilizadas foram sempre superiores a 150 mg/kg (entre 1 a 4 g/kg/dia, variável no modo de administração) (Campbell & Dachs, 2014). Por outro lado, estudos clínicos publicados com 24 doentes com cancro metastático em fase terminal tratados com vitamina C por via intravenosa, com concentrações de 150 a 710 mg/kg/dia não permitiram a obtenção de concentrações de AA no plasma superiores a 3,8 mM (Riordan *et al*, 2005). No entanto, um ensaio clínico na fase I realizado mais recentemente com 24 doentes com tumor hematológico ou sólido localmente avançado, com metástases ou refratário, demonstrou que injeções intravenosas de vitamina C, na concentração de 1,5 g/kg três vezes por semana, são seguras e permitem obter concentrações no plasma superiores a 10 mM durante várias horas (Hoffer *et al*, 2008). Estes estudos evidenciam que, apesar da diminuição da taxa de crescimento tumoral observada no nosso estudo, uma concentração superior de ácido ascórbico é passível de ser administrada e poderá aumentar o efeito terapêutico induzido.

Outro fator determinante no efeito da vitamina C *in vivo* é a via de administração. A vitamina C tem funções distintas quando presente no plasma em concentrações fisiológicas ou farmacológicas. A administração oral de vitamina C é associada a concentrações no plasma estritamente controladas, dada a sua regulação por princípios farmacocinéticos de biodisponibilidade e de depuração (Wilson *et al*, 2014). Este facto exclui a administração por via oral como uma abordagem adequada aos objetivos do nosso estudo. Por outro lado, a administração por via intravenosa ultrapassa este controlo farmacocinético, o que permite atingir concentrações de vitamina C no plasma superiores a 20 mM (Du *et al*, 2012; Wilson *et al*, 2014). A administração por via intravenosa constitui uma limitação no modelo animal de ratinho, pela dificuldade de acesso aos vasos sanguíneos. Apesar de não ser impossível, a administração por via intravenosa realizada diariamente durante 12 dias, tornar-se-ia inexecutável. Verrax e seus coautores mostraram *in vivo* que, tanto a administração intravenosa como intraperitoneal de ascorbato permitiram alcançar concentrações farmacológicas no sangue (acima de 20 mM), em contraste com as concentrações atingidas por via oral que se mantiveram fisiológicas. Para além disso, os autores demonstraram ainda que a administração parental de ascorbato diminuiu a taxa de crescimento de um hepatoma murino, facto não conseguido com a administração oral (Verrax & Calderon, 2009). Estes dados corroboram os nossos resultados que foram obtidos com a administração intraperitoneal de ácido ascórbico e confirmam que a via de administração foi adequada ao efeito pretendido.

Seguidamente, avaliou-se o efeito da combinação do ácido ascórbico com os três fármacos utilizados nos regimes de quimioterapia convencional para o tratamento do cancro colorretal. Comparando o grupo 5-FU com o grupo AA+5-FU, verificou-se que a combinação de ambos os compostos não trouxe benefício relativamente ao uso do 5-FU em monoterapia, tendo em conta que as curvas da taxa de crescimento tumoral foram praticamente sobreponíveis. De facto, estes resultados estão em consonância com os resultados *in vitro*, nos quais a existência de sinergia entre o AA e o 5-FU foi limitada. De maneira interessante, o índice proliferativo associado à combinação de AA+5-FU revelou ser inferior ao tratamento com 5-FU em monoterapia. Estudos realizados por outros autores nos quais a combinação de AA com 5-FU foi avaliada em células de

cancro do esófago mostraram que o AA sensibiliza as células ao efeito deste fármaco pela inibição da ativação do NF- $\kappa$ B e do AP-1 (Abdel-Latif *et al*, 2005). Outros autores reportaram também que a vitamina C é capaz de suprimir a ativação do NF- $\kappa$ B pela inibição da ativação do TNF- $\alpha$ , tendo por base o conhecimento de que o TNF- $\alpha$  ativa o NF- $\kappa$ B por uma via bem definida que envolve a ativação de caspases (Cárcamo *et al*, 2002). Por sua vez, outro estudo realizado com células de linhas celulares de cancro do cólon mostrou que o TNF- $\alpha$  induziu morte celular. De referir que a extensão do efeito citotóxico do TNF- $\alpha$  se correlacionou com a inibição da atividade do NF- $\kappa$ B e foi dependente da linha celular. Uma das linhas celulares que mostrou ser resistente ao tratamento com TNF- $\alpha$  foi a linha celular WiDr (Han *et al*, 2000). Assim, considerando que a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B pode estar envolvida no mecanismo de ação do AA com o 5-FU, a resistência intrínseca desta linha celular a este mecanismo pode justificar a limitada sinergia entre os compostos.

No nosso estudo, o tratamento com oxaliplatina em regime combinado com o ácido ascórbico fez com que a taxa de crescimento tumoral se mantivesse constante, inibição que mostrou ser estatisticamente significativa em relação aos restantes grupos experimentais (grupo controlo, grupo AA e grupo Oxa). À semelhança dos respetivos estudos *in vitro*, esta foi a combinação mais promissora. Este facto refletiu-se também nos dados da imunohistoquímica com a redução do índice proliferativo da terapia combinada relativamente ao grupo de animais tratados apenas com oxaliplatina. Até aos nossos resultados, não existiam estudos com a combinação de AA com oxaliplatina em qualquer tipo de modelos animais. Os dados obtidos com este regime de combinação enfatizam o potencial desta terapia na prática clínica e a importância de ampliar os estudos *in vivo* para modelos animais ortotópicos de cancro colorretal. Estes modelos animais simulam o microambiente do tumor original, com respostas patológicas e imunológicas intactas. Os componentes celulares não tumorais do estroma, como as células inflamatórias, os macrófagos, os fibroblastos e as células endoteliais, assim como citocinas, quimiocinas, componentes da matriz celular e proteínas de adesão influenciam a história natural do tumor em termos de proliferação, de angiogénese, de invasão e de metastização, mas também são especificamente capazes de alterar a

resposta a distintos agentes terapêuticos. A sua influência poderá ser no sentido de aumentar a sensibilidade ao tratamento, ou aumentar a resistência intrínseca ao mesmo. Por conseguinte, os modelos animais ortotópicos permitem a avaliação, a um nível quimiopreventivo ou terapêutico, dos efeitos de compostos citotóxicos no crescimento do tumor primário, num microambiente apropriado, bem como o seu impacto na invasão tumoral localizada, na disseminação metastática e no surgimento de resistência terapêutica adquirida (Ruggeri *et al*, 2014).

Por último, estudou-se o efeito da combinação de ácido ascórbico com irinotecano no crescimento tumoral. Analisando a resposta obtida para o grupo AA+Iri verificou-se que o tratamento combinado induziu a estabilização do volume tumoral durante os 14 dias de avaliação. Em comparação com os restantes grupos, inclusivamente com o grupo tratado com irinotecano em monoterapia, a inibição do crescimento tumoral foi a mais evidente. Os dados da histologia não confirmam estas evidências, na medida em que o índice proliferativo associado ao tratamento apenas com irinotecano foi consideravelmente inferior à respetiva terapia combinada com AA. Contudo, a relevância do valor do índice proliferativo da amostra histológica correspondente ao grupo Iri é questionável, tendo em conta que, por limitações experimentais, não foi possível obter uma réplica desta condição e o bloco de parafina de conservação desta peça tumoral não estava nas melhores condições. De facto, a inibição completa da taxa de crescimento tumoral em resposta ao tratamento de AA com irinotecano foi deveras interessante, e contrariou a ausência de sinergia verificada nos estudos *in vitro* com esta combinação. Um olhar mais atento sobre o mecanismo de ação do irinotecano poderá explicar a discrepância existente entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, e foi a justificação apresentada aquando da discussão dos estudos *in vitro* para a ausência de sinergia. O irinotecano é um pro-fármaco que requer a clivagem enzimática no carbono na posição 10 por carboxilesterases para a formação do seu metabolito biologicamente ativo, o SN-38 (Chabner & Longo, 2010). Apesar de Jonsson e seus coautores terem demonstrado o efeito biológico do irinotecano num modelo *in vitro* humanizado de cancro colorretal (Jonsson *et al*, 2000), vários autores referem que o SN-38 é o principal responsável pelos efeitos biológicos daquele fármaco (Mathijssen *et al*, 2001; Haug *et al*, 2008; Wagner, 2015). A atividade das enzimas carboxilesterases em tecidos humanos

normais é maior no fígado, seguido no duodeno, no jejuno, no íleo, no cólon e no reto (Rothenberg, 2001). No modelo *in vitro*, mesmo que possa ser detetada alguma atividade destas enzimas, nunca será tão elevada como nos tecidos normais, que se sabe serem responsáveis pela metabolização do irinotecano em SN-38. O modelo animal usado revelou o potencial sinérgico da combinação de ácido ascórbico com irinotecano, sendo igualmente imprescindível o seguimento dos estudos para o modelo animal ortotópico com otimização das concentrações ideais para obtenção de um efeito sinérgico *in vivo*, prévio à sua implementação em ensaios clínicos.

## PARTE III

# CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS





Quais as razões subjacentes à sensibilidade ou à resistência das células tumorais ao tratamento com vitamina C? Porque é que as células tumorais são sensíveis a concentrações farmacológicas de vitamina C, enquanto as células normais são normalmente resistentes? Podemos considerar que a resposta a estas perguntas, está na base deste trabalho. Compreender os mecanismos de atuação da vitamina C na célula tumoral é de sobremaneira relevante, visto que tal entendimento poderá, pelo menos parcialmente, reduzir o ceticismo em torno da eficácia, como terapêutica citotóxica, da vitamina C. Mais importante ainda, coloca-se a possibilidade de orientar as decisões terapêuticas, sabendo quais os doentes oncológicos que poderão beneficiar da terapia com concentrações farmacológicas de vitamina C.

Os dados apresentados ao longo deste trabalho enfatizaram o potencial terapêutico da vitamina C, estudada na sua forma reduzida, o ácido ascórbico, e contribuíram para a elucidação de alguns dos possíveis mecanismos de atuação da vitamina C nas células de cancro colorretal.

Os estudos de citotoxicidade sugeriram que o ácido ascórbico diminui a proliferação, a sobrevivência e a viabilidade das células das três linhas de cancro colorretal usadas, de um modo dependente da linha celular e da concentração de ácido ascórbico, com efeitos genotóxicos associados. Como consequência, verificámos que as vias de morte ativadas pelo ácido ascórbico são dependentes da sensibilidade das linhas celulares ao stresse oxidativo e da intensidade do estímulo oxidativo. Os resultados obtidos nas três linhas celulares em estudo permitiram-nos propor três possíveis mecanismos de ação do ácido ascórbico na célula de cancro colorretal.

No primeiro mecanismo proposto (Anexo II extensível, Figura 72), baseado nos resultados obtidos nas células C2BBel, verificámos que o ácido ascórbico pode atuar por um mecanismo dependente de ROS e independente de P53, com ativação da morte celular por apoptose e por necrose. O ácido ascórbico poderá mediar a produção de peróxido de hidrogénio a nível extracelular. No entanto, a maior fonte de ROS parece ser mediada pela presença de ácido ascórbico no interior da célula, cujo influxo é feito via direta pelo SVCT-1 e pelo SVCT-2, mas também via indireta pelo GLUT-1. Uma vez no interior da célula, a conversão de AA em radical ascorbil disponibiliza eletrões ao

oxigénio molecular, aumentando a produção intracelular de radical superóxido. Esta ROS induzirá a disrupção abrupta do  $\Delta\psi_m$ , com conseqüente desencadeamento da via intrínseca da apoptose, com ativação da caspase-9. Concentrações mais elevadas de ácido ascórbico irão originar maior produção de radical superóxido, com maior impacto na disfunção mitocondrial e conseqüente depleção de ATP e morte celular por necrose.

Elevadas concentrações de ácido ascórbico são também capazes de ultrapassar os mecanismos de resistência e de adaptação ao aumento de stresse oxidativo intrínsecos à linha celular LS1034. O segundo mecanismo de ação do ácido ascórbico proposto (Anexo II extensível, Figura 73) é independente de caspases, de ROS e da P53, mas dependente da sua entrada na célula tumoral. Uma vez no interior da célula, o ácido ascórbico ativa a via intrínseca da apoptose, de modo que o aumento da proteína pró-apoptótica BAX e a disrupção do  $\Delta\psi_m$  resultarão na libertação da proteína AIF da mitocôndria para o núcleo. No núcleo, a proteína AIF irá exercer a sua função pró-apoptótica iniciando a fragmentação do DNA.

O terceiro mecanismo de citotoxicidade do ácido ascórbico proposto foi baseado nos resultados obtidos nas células WiDr (Anexo II extensível, Figura 74). Através deste, o efeito anti-tumoral é desencadeado pela sua auto-oxidação no meio extracelular, mediando a produção de radical superóxido e, por ação da SOD, a formação de peróxido de hidrogénio. Quanto maior a concentração de ácido ascórbico, mais intenso será o estímulo oxidativo com maior produção de ROS. Por sua vez, o peróxido de hidrogénio difunde-se para o meio intracelular onde é convertido em radical hidroxilo pela reação de *Fenton*. O aumento do stresse oxidativo conduzirá à despolarização da membrana externa mitocondrial e, naturalmente, ao desencadeamento da apoptose. Concentrações de ácido ascórbico mais elevadas induzem disfunção mitocondrial acrescida de disfunção energética que, por sua vez, promove a depleção de ATP. Na ausência de ATP, as caspases são inibidas e o processo apoptótico não ocorre, o que, acoplado à acumulação da P53 na matriz mitocondrial, conduz a célula à morte por necrose.

As evidências do efeito citotóxico do ácido ascórbico instigam à sua inclusão num regime de combinação com fármacos comumente utilizados na quimioterapia

convencional para o tratamento de cancro colorretal.

De uma forma geral, concentrações elevadas de ácido ascórbico sensibilizaram as três linhas celulares ao efeito do 5-FU, da oxaliplatina e do irinotecano. Os efeitos anti-proliferativos mais notórios observaram-se quando o ácido ascórbico estava presente em maior proporção.

A combinação do ácido ascórbico com o 5-FU poderá constituir uma abordagem terapêutica para tumores resistentes. A combinação de ácido ascórbico com oxaliplatina revelou ser a mais promissora. O sucesso desta sinergia pode residir no facto do principal alvo molecular de ambas as terapias ser a molécula de DNA. O estudo detalhado dos possíveis mecanismos de sinergia entre o ácido ascórbico e a oxaliplatina evidenciaram resultados dependentes da linha celular.

Os estudos *in vivo* constituíram um complemento essencial aos estudos *in vitro*, destacando-se alguns factos primordiais. A combinação de ácido ascórbico com 5-FU não representou benefício relativamente ao uso do 5-FU em monoterapia. A combinação de ácido ascórbico com oxaliplatina provocou uma estagnação da taxa de crescimento tumoral, constando-se novamente ser a combinação testada mais promissora. Em oposição à ausência de sinergia verificada nos estudos *in vitro* com a combinação de ácido ascórbico com irinotecano, o modelo animal revelou o potencial terapêutico desta combinação.

Este trabalho de investigação evidenciou que a vitamina C medeia mecanismos de ativação de morte da célula tumoral e sensibiliza-a para o efeito de fármacos de quimioterapia convencional como a oxaliplatina e o irinotecano. Contudo, vários parâmetros deverão ser futuramente analisados.

No contexto da investigação pré-clínica, a continuidade deste trabalho deverá incluir a prossecução do estudo do efeito da vitamina C em células não-tumorais e em células de cancro colorretal com características genéticas diferentes. A seletividade do efeito terapêutico da vitamina C é um fator de extrema relevância clínica que deverá ser estudado em detalhe. Os mecanismos de atuação da vitamina C propostos incluíram algumas moléculas e/ou eventos que aparentam estar envolvidos, mas que não foram

quantificados, como por exemplo, o citocromo-C, a proteína AIF, a CypD, a produção de radical hidroxilo, a produção extracelular de peróxido de hidrogénio, a depleção de ATP, entre outros. Por conseguinte, a deteção e a quantificação destas moléculas é de extrema relevância para o esclarecimento das funções anti-tumorais da vitamina C. Considerando o modelo animal heterotópico usado, este constituiu uma excelente primeira abordagem para a avaliação do efeito quimiossensibilizante da vitamina C, no entanto é imprescindível o seguimento dos estudos *in vivo* para o modelo ortotópico de cancro colorretal. Este modelo animal permitirá mimetizar com maior rigor o microambiente natural do tumor e simular e avaliar as respostas patológicas e, em parte, as respostas imunológicas à terapêutica. Para além disso, permitirá quantificar as concentrações de vitamina C e a produção de espécies reativas de oxigénio no sangue, no plasma e no tumor.

No contexto da investigação clínica, é imperativa a realização de ensaios clínicos randomizados e duplamente cegos com doentes com cancro colorretal, cujo tratamento inclua regimes de combinação de fármacos, entre os quais a oxaliplatina e o irinotecano, com concentrações farmacológicas de vitamina C.

## PARTE IV

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abdel-Latif MMM, Raouf AA, Sabra K, Kelleher D, Reynolds J V (2005) Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells in vitro. *J Chemother* **17**: 539–549, doi:10.1179/joc.2005.17.5.539.
- Abrantes AM (2013) Hipoxia Tumoral – Metabonómica e Imagem Estudo Experimental. University of Coimbra.
- Abrantes AM, Serra MES, Gonçalves AC, Rio J, Oliveiros B, Laranjo M, Rocha-Gonsalves AM, Sarmiento-Ribeiro AB, Botelho MF (2010) Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with <sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>99m</sup>Tc-HL-91 uptake in colon cancer cells. *Nucl Med Biol* **37**: 125–132, doi:10.1016/j.nucmedbio.2009.11.001.
- Abrantes AM, Tavares LC, Pires S, Casalta-Lopes J, Mendes C, Simões M, Grazina MM, Carvalho RA, Botelho MF (2014) Metabolic effects of hypoxia in colorectal cancer by <sup>13</sup>C NMR isotopomer analysis. *Biomed Res Int* **2014**: 1–10, doi:10.1155/2014/759791.
- Almohaimeed B, Donev AN (2014) Experimental designs for drug combination studies. *Comput Stat Data Anal* **71**: 1077–1087, doi:10.1016/j.csda.2013.01.007.
- American Type Culture Collection (2015) Colon Cancer P53 mutation cell panel [www.lgcstandards-atcc.org/~media/F225B87D7E6143CFBB67E3BA6AE7CEF8.ashx](http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/F225B87D7E6143CFBB67E3BA6AE7CEF8.ashx) (accessed: 19/03/2015).
- An SH, Kang JH, Kim DH, Lee MS (2011) Vitamin C increases the apoptosis via up-regulation p53 during cisplatin treatment in human colon cancer cells. *BMB Rep* **44**: 211–216, doi:10.5483/BMBRep.2011.44.3.211.
- Arango D, Wilson a J, Shi Q, Corner G a, Arañes MJ, Nicholas C, Lesser M, Mariadason JM, Augenlicht LH (2004) Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* **91**: 1931–1946, doi:10.1038/sj.bjc.6602215.
- Ayyagari VN, Brard L (2014) Bithionol inhibits ovarian cancer cell growth in vitro - studies on mechanism(s) of action. *BMC Cancer* **14**: 1–17, doi:10.1186/1471-2407-14-61.
- Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T (2016) Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Nat Publ Gr* **6**: 1–11, doi:10.1038/cddis.2015.275.
- Ball G (2004) Vitamins: Their role in the human body (London: Blackwell).
- Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A (1999) Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J Immunol* **162**: 1466–1479, doi:10.1016/j.str.2010.08.012.Structure.
- Barrera G (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**: 1–21, doi:10.5402/2012/137289.
- Barton JC, McDonnell SM, Adams PC, Brissot P, Powell LW, Edwards CQ, Cook JD, Kowdley

- K V (1998) Management of hemochromatosis. Hemochromatosis Management Working Group. *Ann Intern Med* **129**: 932–939.
- Bauer G (2015) Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. *Redox Biol* **6**: 353–371, doi:10.1016/j.redox.2015.07.017.
- Benada J, Macurek L (2015) Targeting the checkpoint to kill cancer cells. *Biomolecules* **5**: 1912–1937, doi:10.3390/biom5031912.
- Bogaert J, Prenen H (2014) Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* **27**: 9–14, doi:10.1136/flgastro-2013-100329.
- Boulahebel H, Durán R V, Gottlieb E (2009) Prolyl hydroxylases as regulators of cell metabolism. *Biochem Soc Trans* **37**: 291–294, doi:10.1042/BST0370291.
- Bowen D, Southerland WM, Hawkins M, Johnson DH (2000) Sequence-dependent antagonism between tamoxifen and methotrexate in human breast cancer cells. *Anticancer Res* **20**: 1415–1417.
- Boyer JC, Campbell CE, Sigurdson WJ, Kuo SM (2005) Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 150–156, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.069.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014) Colorectal cancer. *Lancet* **383**: 1490–1502, doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- Brown JM, Wouters BG (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* **59**: 1391–1399.
- Cai Y, Lu J, Miao Z, Lin L, Ding J (2007) Reactive oxygen species contribute to cell killing and P-glycoprotein downregulation by salvicine in multidrug resistant K562/A02 cells. *Cancer Biol Ther* **6**: 1794–1799.
- Cameron E, Pauling L (1976) Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 3685–3689.
- Cameron E, Pauling L (1978) Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 4538–4542.
- Campbell EJ, Dachs GU (2014) Current limitations of murine models in oncology for ascorbate research. *Front Oncol* **4**: 1–7, doi:10.3389/fonc.2014.00282.
- Cancer AJC on (2015) AJCC Cancer Staging Manual (New York, NY: Springer New York Dordrecht Heidelberg London).
- Cárcamo JM, Pedraza A, Bórquez-Ojeda O, Golde DW (2002) Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. *Biochemistry* **41**: 12995–13002, doi:10.1021/bi0263210.



- Carosio R, Zuccari G, Orienti I, Mangraviti S, Montaldo PG (2007) Sodium ascorbate induces apoptosis in neuroblastoma cell lines by interfering with iron uptake. *Mol Cancer* **6**: 1–11, doi:10.1186/1476-4598-6-55.
- Carr AC, Vissers MCM, Cook J (2014) Relief from cancer chemotherapy side effects with pharmacologic vitamin C. *J New Zeal Med Assoc* **127**: 1–6.
- Casalta-Lopes J, Abrantes A, Laranjo M, Rio J, Gonçalves A, Oliveiros B, Sarmiento-Ribeiro A, Botelho M (2011) Efflux pumps modulation in colorectal adenocarcinoma cell lines: the role of nuclear medicine. *J Cancer Ther* **2**: 408–417, doi:10.4236/jct.2011.23056.
- Casciari JJ, Riordan HD, Miranda-Massari JR, Gonzalez MJ (2005) Effects of high dose ascorbate administration on L-10 tumor growth in guinea pigs. *P R Health Sci J* **24**: 145–150.
- Catenacci D, Kozloff M, Kindler H, Polite B (2011) Personalized colon cancer care in 2010. *Semin Oncol* **38**: 284–308, doi:10.1053/j.seminoncol.2011.01.001.Personalized.
- Cekanova M, Rathore K (2014) Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. *Drug Des Devel Ther* **8**: 1911–1922, doi:10.2147/DDDT.S49584.
- Cerqueira BBS, Lasham A, Shelling AN, Al-Kassas R (2015) Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft fur Pharm Verfahrenstechnik eV* **97**: 140–151, doi:10.1016/j.ejpb.2015.10.007.
- Céspedes M V, Casanova I, Parreño M, Manges R (2006) Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol* **8**: 318–329.
- Chabner BA, Longo DL (2010) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice* (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- Chen L, Zhu H, Pan Y, Tang C, Watanabe M, Ruan H, Wang Y, Wang J, Yao H-Y, Iguchi T, Wu X (2012a) Ascorbic acid uptaken by sodium-dependent vitamin C transporter 2 induces  $\beta$ hCG expression through Sp1 and TFAP2A transcription factors in human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: E1667–E1676, doi:10.1210/jc.2012-1753.
- Chen P, Stone J, Sullivan G, Drisko J a, Chen Q (2011) Anti-cancer effect of pharmacologic ascorbate and its interaction with supplementary parenteral glutathione in preclinical cancer models. *Free Radic Biol Med* **51**: 681–687, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.031.
- Chen P, Yu J, Chalmers B, Drisko J, Yang J, Li B, Chen Q (2012b) Pharmacological ascorbate induces cytotoxicity in prostate cancer cells through ATP depletion and induction of autophagy. *Anticancer Drugs* **23**: 437–444, doi:10.1097/CAD.0b013e32834fd01f.
- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M (2005) Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Cell* **102**: 13604–13609.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee J-H, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL,

- Buettner GR, Levine M (2007) Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8749–8754, doi:10.1073/pnas.0702854104.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M (2008a) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11105–11109, doi:10.1073/pnas.0804226105.
- Chen Q, Polireddy K, Chen P, Dong R (2015a) The unpaved journey of vitamin C in cancer treatment <sup>1</sup>. *Can J Physiol Pharmacol* **93**: 1055–1063, doi:10.1139/cjpp-2014-0509.
- Chen S, Cheng A-C, Wang M-S, Peng X (2008b) Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J Gastroenterol* **14**: 2174–2178.
- Chen T, Ren Z, Ye L-C, Zhou P-H, Xu J-M, Shi Q, Yao L-Q, Zhong Y-S (2015b) Factor inhibiting HIF1 $\alpha$  (FIH-1) functions as a tumor suppressor in human colorectal cancer by repressing HIF1 $\alpha$  pathway. *Cancer Biol Ther* **16**: 244–252, doi:10.1080/15384047.2014.1002346.
- Chiu S-J, Lee Y-J, Hsu T-S, Chen W-S (2009) Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and -independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* **182**: 173–182, doi:10.1016/j.cbi.2009.08.019.
- Choi K, Kim J, Kim GW, Choi C (2009) Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res* **6**: 213–222, doi:10.2174/156720209789630375.
- Chung JK, Lee YJ, Kim C, Choi SR, Kim M, Lee K, Jeong JM, Lee DS, Jang JJ, Lee MC (1999) Mechanisms related to [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose uptake of human colon cancers transplanted in nude mice. *J Nucl Med* **40**: 339–346.
- Cieslak JA, Cullen JJ (2015) Treatment of pancreatic cancer with pharmacological ascorbate. *Curr Pharm Biotechnol* **16**: 759–770.
- Circu ML, Aw TY (2012) Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1767–1777, doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
- Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, Pinedo HM, Franchi F, Noordhuis P, Braakhuis BJ, van Laar J a, Peters GJ (1995) Antitumour activity, toxicity and inhibition of thymidylate synthase of prolonged administration of 5-fluorouracil in mice. *Eur J Cancer* **31A**: 1517–1525, doi:10.1016/0959-8049(95)00218-8.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* **26**: 249–261.
- Corpe CP, Eck P, Wang J, Al-Hasani H, Levine M (2013) Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem* **288**: 9092–9101, doi:10.1074/jbc.M112.436790.

- Corti A, Casini AF, Pompella A (2010) Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Arch Biochem Biophys* **500**: 107–115, doi:10.1016/j.abb.2010.05.014.
- da Costa Vieira RA, Tramonte MS, Lopes LF (2015) Colorectal carcinoma in the first decade of life: a systematic review. *Int J Colorectal Dis* **30**: 1001–1006, doi:10.1007/s00384-015-2202-1.
- Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, Schutt AJ, O'Connell MJ, Rubin J, Frytak S (1979) Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *N Engl J Med* **301**: 687–690, doi:10.1056/NEJM197909273011303.
- Cullen JJ (2010) Ascorbate induces autophagy in pancreatic cancer. *Autophagy* **6**: 421–422, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1713.Autophagy.
- Dagrosa MA, Viaggi M, Longhino J, Calzetta O, Cabrini R, Edreira M, Juvenal G, Pisarev MA (2003) Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**: 1084–1092, doi:10.1016/S0360-3016(03)00778-8.
- Deitch AD, Law H, deVere White R (1982) A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *J Histochem Cytochem* **30**: 967–972, doi:10.1177/30.9.6182188.
- Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA (2011) AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* **63**: 221–232, doi:10.1002/iub.432.
- Dellaire G, Berman JN, Arceci RJ (2014) Cancer Genomics. In *Cancer Genomics*, (Oxford: Elsevier), pp. 213–232.
- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A (2014) Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64**: 252–271, doi:10.3322/caac.21235.
- Deubzer B, Mayer F, Kuçi Z, Niewisch M, Merkel G, Handgretinger R, Bruchelt G (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin. *Cell Physiol Biochem* **25**: 767–774, doi:10.1159/000315098.
- Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J (2014) The evolution of our molecular understanding of colorectal cancer: what we are doing now, what the future holds, and how tumor profiling is just the beginning. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **34**: 91–99, doi:10.14694/EdBook\_AM.2014.34.91.
- Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**: 717–727, doi:10.1016/j.hbb.2008.05.010.
- Ding X, Xu Q, Liu F, Zhou P, Gu Y, Zeng J, An J, Dai W, Li X (2004) Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Lett* **216**:

- 43–54, doi:10.1016/j.canlet.2004.07.005.
- Dixon SJ, Stockwell BR (2014) The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* **10**: 9–17, doi:10.1038/nchembio.1416.
- Drisko J, Chapman J, Hunter V (2003) The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol Oncol* **88**: 434–439, doi:10.1016/S0090-8258(02)00067-7.
- Du J, Cieslak JA, Welsh JL, Sibenaller ZA, Allen BG, Wagner BA, Kalen AL, Doskey CM, Strother RK, Button AM, Mott SL, Smith B, Tsai S, Mezhir J, Goswami PC, Spitz DR, Buettner GR, Cullen JJ (2015a) Pharmacological ascorbate radiosensitizes pancreatic cancer. *Cancer Res* **75**: 3314–3326, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1707.
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR (2012) Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* **1826**: 443–457, doi:10.1016/j.bbcan.2012.06.003.
- Du J, Martin SM, Levine M, Wagner BA, Buettner GR, Wang S -h., Taghiyev AF, Du C, Knudson CM, Cullen JJ (2010) Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 509–520, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1713.
- Du J, Wagner B a., Buettner GR, Cullen JJ (2015b) Role of labile iron in the toxicity of pharmacological ascorbate. *Free Radic Biol Med* **84**: 289–295, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.033.
- Duarte TL, Almeida GM, Jones GDD (2007) Investigation of the role of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxicol Lett* **170**: 57–65, doi:10.1016/j.toxlet.2007.02.005.
- Duconge J, Miranda-Massari JR, Gonzalez MJ, Jackson JA, Warnock W, Riordan NH (2008) Pharmacokinetics of vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. *P R Health Sci J* **27**: 7–19.
- Durko L, Malecka-Panas E (2014) Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* **10**: 45–54, doi:10.1007/s11888-013-0203-4.
- Efsa (2013) Scientific opinion on dietary reference values for vitamin C. *EFSA J* **11**: 1–68, doi:10.2903/j.efsa.2013.3418.
- Encarnação JC, Abrantes AM, Pires AS, Botelho MF (2015) Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment. *Cancer Metastasis Rev* **34**: 465–478, doi:10.1007/s10555-015-9578-9.
- Ernst E, Cassileth BR (1998) The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: a systematic review. *Cancer* **83**: 777–782.
- Espey MG, Chen P, Chalmers B, Drisko J, Sun AY, Levine M, Chen Q (2011) Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med* **50**: 1610–1619, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.007.
- Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM (2003) DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* **66**: 225–237,

doi:10.1016/S0006-2952(03)00260-0.

- Farruggia P, Puccio G, Sala A, Todesco A, Buffardi S, Garaventa A, Bottigliero G, Bianchi M, Zecca M, Locatelli F, Pession A, Pillon M, Favre C, D'Amico S, Provenzi M, Trizzino A, Zanazzo GA, Sau A, Santoro N, Murgia G, Casini T, Mascarin M, Burnelli R (2016) The prognostic value of biological markers in paediatric Hodgkin lymphoma. *Eur J Cancer* **52**: 33–40, doi:10.1016/j.ejca.2015.09.003.
- Fearon EF, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759–767.
- Figuerola-Méndez R, Rivas-Arancibia S (2015) Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front Physiol* **6**: 1–11, doi:10.3389/fphys.2015.00397.
- Flashman E, Davies SL, Yeoh KK, Schofield CJ (2010) Investigating the dependence of the hypoxia-inducible factor hydroxylases (factor inhibiting HIF and prolyl hydroxylase domain 2) on ascorbate and other reducing agents. *Biochem J* **427**: 135–142, doi:10.1042/BJ20091609.
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL (2012) Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* **3**: 153–173, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030.
- Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**: 2315–2319, doi:10.1038/nprot.2006.339.
- Frei B, Lawson S (2008) Vitamin C and cancer revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11037–11038, doi:10.1073/pnas.0806433105.
- Frömberg A, Gutsch D, Schulze D, Vollbracht C, Weiss G, Czubyko F, Aigner A (2011) Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* **67**: 1157–1166, doi:10.1007/s00280-010-1418-6.
- Fuchs C, Mitchell EP, Hoff PM (2006) Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* **32**: 491–503, doi:10.1016/j.ctrv.2006.07.001.
- Fujita K, Shinpo K, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, Nagatsu T, Takeuchi T, Umezawa H (1982) Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res* **42**: 309–316.
- Fukui M, Yamabe N, Choi H-J, Polireddy K, Chen Q, Zhu BT (2015) Mechanism of ascorbate-induced cell death in human pancreatic cancer cells: Role of Bcl-2, Beclin 1 and autophagy. *Planta Med* **81**: 838–846, doi:10.1055/s-0035-1546132.
- Gabriel J (2013) *The Biology of Cancer* (England: John Wiley & Sons, Inc.).
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J,

- Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**: 107–120, doi:10.1038/cdd.2011.96.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei a. a. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* **55**: 178–194, doi:10.3322/canjclin.55.3.178.
- Gilloteaux J, Jamison JM, Neal D, Summers JL (2014) Synergistic antitumor cytotoxic actions of ascorbate and menadione on human prostate (DU145) cancer cells in vitro: nucleus and other injuries preceding cell death by autophagy. *Ultrastruct Pathol* **38**: 116–140.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2008) Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* **18**: 165–173, doi:10.1016/j.tcb.2008.01.006.
- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**: 37–43, doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001.
- Gonçalves AC, Alves V, Silva T, Carvalho C, Oliveira CR de, Sarmiento-Ribeiro AB (2013) Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicol Vitro* **27**: 1542–1549, doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009.
- Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M (2015) Colorectal cancer biomarkers: Where are we now? *Biomed Res Int* **2015**: 1–14, doi:10.1155/2015/149014.
- Goodman A (2015) Vitamin C and cancer. *AIMS Med Sci* **2**: 41–51, doi:10.3934/medsci.2016.1.41.
- Graham DM, Coyle VM, Kennedy RD, Wilson RH (2016) Molecular subtypes and personalized therapy in metastatic colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* **12**: 141–150, doi:10.1007/s11888-016-0312-y.
- Grem JL (1997) Mechanisms of action and modulation of fluorouracil. *Semin Radiat Oncol* **7**: 249–259, doi:10.1016/S1053-4296(97)80023-9.
- Grivicich I, Mans DR, Peters GJ, Schwartzmann G (2001) Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *Brazilian J Med Biol Res* **34**: 1087–1103.
- Guichard S, Chatelut E, Lochon I, Bugat R, Mahjoubi M, Canal P (1998) Comparison of the pharmacokinetics and efficacy of irinotecan after administration by the intravenous versus intraperitoneal route in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**: 165–170, doi:10.1007/s002800050801.
- Güner G, Kirkali G, Yenisey C, Töre IR (1992) Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma. *Cancer Lett* **67**: 103–112, doi:10.1016/0304-3835(92)90132-F.
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**: 231–255, doi:10.1038/sj.bjp.0705776.
- Han SY, Choung SY, Paik IS, Kang HJ, Choi YH, Kim SJ, Lee MO (2000) Activation of NF-kappaB determines the sensitivity of human colon cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis.

- Biol Pharm Bull* **23**: 420–426, doi:10.1248/cpb.37.3229.
- Hann HW, Lange B, Stahlhut MW, McGlynn KA (1990) Prognostic importance of serum transferrin and ferritin in childhood Hodgkin's disease. *Cancer* **66**: 313–316.
- Haug K, Kravik KL, De Angelis PM (2008) Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. *Anticancer Res* **28**: 583–592.
- Hedley DW, Chow S (1994) Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**: 349–358, doi:10.1002/cyto.990150411.
- Heftmann E (2004) *Chromatography* (Amsterdam: Elsevier).
- Herst PM, Broadley KWR, Harper JL, McConnell MJ (2012) Pharmacological concentrations of ascorbate radiosensitize glioblastoma multiforme primary cells by increasing oxidative DNA damage and inhibiting G2/M arrest. *Free Radic Biol Med* **52**: 1486–1493, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.021.
- Hesketh R (2013) *Introduction to Cancer Biology* (Cambridge: Cambridge University Press).
- Hickey S, Roberts H (2004) *Ascorbate: The science of vitamin C*.
- Hoffer LJ, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Padayatty SJ, Rosadiuk K, Rousseau C, Robitaille L, Miller WH (2008) Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol* **19**: 1969–1974, doi:10.1093/annonc/mdn377.
- Hoffer LJ, Robitaille L, Zakarian R, Melnychuk D, Kavan P, Agulnik J, Cohen V, Small D, Miller WH (2015) High-dose intravenous vitamin C combined with cytotoxic chemotherapy in patients with advanced cancer: a phase I-II clinical trial. *PLoS One* **10**: 1–19, doi:10.1371/journal.pone.0120228.
- Hong S-W, Jin D-H, Hahm E-S, Yim S-H, Lim J-S, Kim K-I, Yang Y, Lee S-S, Kang J-S, Lee W-J, Lee W-K, Lee M-S (2007) Ascorbate (vitamin C) induces cell death through the apoptosis-inducing factor in human breast cancer cells. *Oncol Rep* **18**: 811–815.
- Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC (2007) The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* **42**: 377–387, doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.003.
- Hrabarova E, Juranek I, Soltes L (2011) Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *Gen Physiol Biophys* **30**: 223–238, doi:10.4149/gpb.
- Huang C-Y, Kuo W-T, Huang Y-C, Lee T-C, Yu LCH (2013) Resistance to hypoxia-induced necroptosis is conferred by glycolytic pyruvate scavenging of mitochondrial superoxide in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis* **4**: e622, doi:10.1038/cddis.2013.149.
- Hughes D, Mehmet H (2003) *Cell Proliferation & Apoptosis* (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd).

- Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan a, Pignatelli M, Bodmer WF (1997) Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10330–10334.
- Institute NC (2016) Clinical Trials Search Results <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/results?protocolsearchid=6192171&vers=2> (accessed: 09/06/2016).
- International Agency for Research on Cancer (2016) Cancer fact sheets <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed: 09/09/2014).
- Iqbal K, Khan A, Khattak MMAK (2004) Biological significance of ascorbic acid (Vitamin C) in human health - A review. *Pakistan J Nutr* **3**: 5–13, doi:10.3923/pjn.2004.5.13.
- Jacobs C, Hutton B, Ng T, Shorr R, Clemons M (2015) Is there a role for oral or intravenous ascorbate (vitamin C) in treating patients with cancer? A systematic review. *Oncologist* **20**: 210–223, doi:10.1634/theoncologist.2014-0381.
- Jonsson E, Dhar S, Jonsson B, Nygren P, Graf W, Larsson R (2000) Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. *Eur J Cancer* **36**: 2120–2127, doi:10.1016/S0959-8049(00)00289-6.
- Jordan A, Stein J (2003) Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on growth of the colon cancer cell line Caco-2. *Eur J Nutr* **42**: 324–331, doi:10.1007/s00394-003-0427-1.
- Kang JS, Cho D, Kim Y-I, Hahm E, Yang Y, Kim D, Hur D, Park H, Bang S, Hwang Y II, Lee WJ (2003) L-ascorbic acid (vitamin C) induces the apoptosis of B16 murine melanoma cells via a caspase-8-independent pathway. *Cancer Immunol Immunother* **52**: 693–698, doi:10.1007/s00262-003-0407-6.
- Kanthan R, Senger J-L, Kanthan SC (2012) Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int* **2012**: 1–14, doi:10.1155/2012/597497.
- Kawada H, Kaneko M, Sawanobori M, Uno T, Matsuzawa H, Nakamura Y, Matsushita H, Ando K (2013) High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 $\alpha$  transcription. *PLoS One* **8**: e62717, doi:10.1371/journal.pone.0062717.
- Kerbel RS (2003) Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther* **2**: S134-139.
- Kiechle FL, Zhang X (2002) Apoptosis: Biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* **326**: 27–45, doi:10.1016/S0009-8981(02)00297-8.
- Kim J, Lee S-D, Chang B, Jin D-H, Jung S-I, Park M-Y, Han Y, Yang Y, II Kim K, Lim J-S, Kang Y-S, Lee M-S (2012) Enhanced antitumor activity of vitamin C via p53 in cancer cells. *Free Radic Biol Med* **53**: 1607–1615, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.079.



- Kim S-Y, Song X, Zhang L, Bartlett DL, Lee YJ (2014) Role of Bcl-xL/Beclin-1 in interplay between apoptosis and autophagy in oxaliplatin and bortezomib-induced cell death. *Biochem Pharmacol* **88**: 178–188, doi:10.1016/j.bcp.2014.01.027.
- Kline CLB, El-Deiry WS (2013) Personalizing colon cancer therapeutics: targeting old and new mechanisms of action. *Pharmaceuticals (Basel)* **6**: 988–1038, doi:10.3390/ph6080988.
- Klingelhoefter C, Kämmerer U, Koospal M, Mühling B, Schneider M, Kapp M, Kübler A, Germer C-T, Otto C (2012) Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *BMC Complement Altern Med* **12**: 1–10, doi:10.1186/1472-6882-12-61.
- Knowles MA, Selby PJ (2005) Introduction to the cellular and molecular biology of cancer (Oxford: Oxford University Press).
- Kontek R, Kontek B, Grzegorzczak K (2013) Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. *Arch Med Sci* **9**: 1006–1012, doi:10.5114/aoms.2013.39791.
- Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, Park SI, Parikh NU, Kim MP, Abbruzzese JL, Ellis LM, Gallick GE (2010) Synergistic activity of the Src family kinase inhibitor Dasatinib and Oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res* **69**: 3842–3849, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2246.Synergistic.
- Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S (2013) The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* **65**: 1174–1194, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**: 3–11, doi:10.1038/cdd.2008.150.
- Kruidering M, Evan GI (2000) Caspase-8 in apoptosis: the beginning of ‘the end’? *IUBMB Life* **50**: 85–90, doi:10.1080/713803693.
- Kuilenburg A Van (2004) Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* **40**: 939–950.
- Kuiper C, Dachs GU, Munn D, Currie MJ, Robinson BA, Pearson JF, Vissers MCM (2014) Increased tumor ascorbate is associated with extended disease-free survival and decreased hypoxia-inducible factor-1 activation in human colorectal cancer. *Front Oncol* **4**: 1–10, doi:10.3389/fonc.2014.00010.
- Kuiper C, Molenaar IGM, Dachs GU, Currie MJ, Sykes PH, Vissers MCM (2010) Low ascorbate levels are associated with increased hypoxia-inducible factor-1 activity and an aggressive

- tumor phenotype in endometrial cancer. *Cancer Res* **70**: 5749–5758, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0263.
- Kuiper C, Vissers MCM (2014) Ascorbate as a co-factor for fe- and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. *Front Oncol* **4**: 1–11, doi:10.3389/fonc.2014.00359.
- Kumar B, Singh S, Verma R (2015) Anticancer potential of dietary vitamin D and ascorbic acid: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **8398**: In press, doi:10.1080/10408398.2015.1064086.
- Kuppusamy P, Li H, Ilangoan G, Cardounel AJ, Zweier JL, Yamada K, Krishna MC, Mitchell JB (2002) Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res* **62**: 307–312.
- Kurbacher CM, Wagner U, Kolster B, Andreotti PE, Krebs D, Bruckner HW (1996) Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett* **103**: 183–189.
- Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, Arnold D (2013) Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **24**: vi64-vi72, doi:10.1093/annonc/mdt354.
- Landriscina M, Maddalena F, Laudiero G, Esposito F (2009) Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2701–2716, doi:10.1089/ars.2009.2692.
- Lane DJR, Chikhani S, Richardson V, Richardson DR (2013) Transferrin iron uptake is stimulated by ascorbate via an intracellular reductive mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 1527–1541, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.010.
- Lane DJR, Richardson DR (2014) The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: Much more than just enhanced iron absorption! *Free Radic Biol Med* **75**: 69–83, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.007.
- Laster SM, Wood JG, Gooding LR (1988) Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* **141**: 2629–2634.
- Leanza L, Zoratti M, Gulbins E, Szabo I (2014) Mitochondrial ion channels as oncological targets. *Oncogene* **33**: 5569–5581, doi:10.1038/onc.2013.578.
- Lee J, Lee I, Han B, Park JO, Jang J, Park C, Kang WK (2011) Effect of simvastatin on cetuximab resistance in human colorectal cancer with KRAS mutations. *J Natl Cancer Inst* **103**: 674–688, doi:10.1093/jnci/djr070.
- Levine M (1999) Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA J Am Med Assoc* **281**: 1415–1423, doi:10.1001/jama.281.15.1415.
- Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park JB, Lazarev A, Graumlich JF, King J, Cantilena LR (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:

3704–3709.

- Levine M, Katz A, Padayatty SJ, Wang Y, Eck P (2005) Vitamin C. In *Encyclopedia of Dietary Supplements*, P.M. Coates, M.R. Blackman, G.M. Cragg, M. Levine, J. Moss, and J.D. White, eds. (New York, NY: Marcel Dekker), pp. 745–755.
- Li X-F, Du Y, Ma Y, Postel GC, Civelek AC (2014) (18)F-fluorodeoxyglucose uptake and tumor hypoxia: revisit (18)f-fluorodeoxyglucose in oncology application. *Transl Oncol* **7**: 240–247, doi:10.1016/j.tranon.2014.02.010.
- Li X-L, Zhou J, Chen Z-R, Chng W-J (2015) P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol* **21**: 84–93, doi:10.3748/wjg.v21.i1.84.
- Li Y, Schellhorn HE (2007) New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr* **137**: 2171–2184.
- Lin S, Lai W, Chou C, Kuo H, Li T, Chung J, Yang J (2006) Sodium ascorbate inhibits growth via the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human malignant melanoma. *Melanoma Res* **16**: 509–519.
- Lin Y-L, Liao J-Y, Yu S-C, Ou D-L, Lin L-I, Tseng L-H, Chang Y-L, Yeh K-H, Cheng A-L (2012) KRAS mutation is a predictor of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cells. *PLoS One* **7**: e50701, doi:10.1371/journal.pone.0050701.
- Lindblad M, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J (2013) Regulation of vitamin C homeostasis during deficiency. *Nutrients* **5**: 2860–2879, doi:10.3390/nu5082860.
- Lipinski B (2011) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* **2011**: 1–9, doi:10.1155/2011/809696.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**: 330–338, doi:10.1038/nrc1074.
- Lopez J, Tait SWG (2015) Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* **112**: 957–962, doi:10.1038/bjc.2015.85.
- Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A (2005) Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* **280**: 41928–41939, doi:10.1074/jbc.M508718200.
- Lutsenko EA, Carcamo JM, Golde DW (2004) A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Mol Cell Biol* **24**: 3150–3156.
- Ly JD, Grubb DR, Lawen A (2003) The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**: 115–128.
- Ma Y, Chapman J, Levine M, Polireddy K, Drisko J, Chen Q (2014) High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Sci Transl Med* **6**: 1–10, doi:10.1126/scitranslmed.3007154.

- Maletzki C, Stier S, Gruenert U, Gock M, Ostwald C, Prall F, Linnebacher M (2012) Establishment, characterization and chemosensitivity of three mismatch repair deficient cell lines from sporadic and inherited colorectal carcinomas. *PLoS One* **7**: e52485, doi:10.1371/journal.pone.0052485.
- Mamede AC (2010) Vitamina C, cancro e citotoxicidade selectiva: Estudos biológicos. Universidade da Beira Interior.
- Mamede AC, Abrantes AM, Pires AS, Tavares SD, Serra ME, Maia JM, Botelho MF (2012a) Radiolabelling of ascorbic acid: a new clue to clarify its action as an anticancer agent? *Curr Radiopharm* **5**: 106–112, doi:10.2174/1874471011205020106.
- Mamede AC, Guerra S, Laranjo M, Carvalho MJ, Oliveira RC, Gonçalves AC, Alves R, Prado Castro L, Sarmento-Ribeiro AB, Moura P, Abrantes AM, Maia CJ, Botelho MF (2015) Selective cytotoxicity and cell death induced by human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* **32**: 1–11, doi:10.1007/s12032-015-0702-z.
- Mamede AC, Pires AS, Abrantes AM, Tavares SD, Gonçalves AC, Casalta-Lopes JE, Sarmento-Ribeiro AB, Maia JM, Botelho MF (2012b) Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr): in vitro and in vivo studies. *Nutr Cancer* **64**: 1049–1057, doi:10.1080/01635581.2012.713539.
- Manda G, Nechifor MT, Neagu T-M (2009) Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr Chem Biol* **3**: 342–366, doi:10.2174/187231309787158271.
- Mandl J, Szarka a, Bánhegyi G (2009) Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* **157**: 1097–1110, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x.
- Maramag C, Menon M, Balaji KC, Reddy PG, Laxmanan S (1997) Effect of vitamin C on prostate cancer cells in vitro: effect on cell number, viability, and DNA synthesis. *Prostate* **32**: 188–195.
- Marques AM, Turner A, de Mello RA (2014) Personalizing medicine for metastatic colorectal cancer: Current developments. *World J Gastroenterol* **20**: 10425–10431, doi:10.3748/wjg.v20.i30.10425.
- Mastrangelo D (2013) High doses of ascorbate kill Y79 retinoblastoma cells in vitro. *J Clin Exp Ophthalmol* **4**: 1–8, doi:10.4172/2155-9570.1000268.
- Mastrangelo D, Massai L, Lo Coco F, Noguera NI, Borgia L, Fioritoni G, Berardi A, Iacone A, Muscettola M, Pelosi E, Castelli G, Testa U, Di Pisa F, Grasso G (2015) Cytotoxic effects of high concentrations of sodium ascorbate on human myeloid cell lines. *Ann Hematol* **94**: 1807–1816, doi:10.1007/s00277-015-2464-2.
- Mastrangelo D, Massai L, Fioritoni G, Iacone A, Bartolomeo P Di, Accorsi P, Bonfini T, Muscettola M, Grasso G (2013) Megadoses of sodium ascorbate efficiently kill HL60 cells in vitro: comparison with arsenic trioxide. *J Cancer Ther* **4**: 1366–1372.
- Masuda K, Kajikawa A, Igimi S (2011) Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel cells and Raji cells. *Biosci microflora* **30**: 37–44, doi:10.12938/bifidus.30.37.

- Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom a (2001) Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* **7**: 2182–2194.
- Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Soares DG, Grivicich I, Saffi J, Larsen AK, Henriques JAP (2010) DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5- fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochem Pharmacol* **79**: 147–153.
- Maulén NP, Henríquez E a, Kempe S, Cárcamo JG, Schmid-Kotsas A, Bachem M, Grünert A, Bustamante ME, Nualart F, Vera JC (2003) Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-confluent differentiated CaCo-2 cells. *J Biol Chem* **278**: 9035–9041, doi:10.1074/jbc.M205119200.
- May JM, Qu ZC, Li X (2003) Ascorbic acid blunts oxidant stress due to menadione in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **411**: 136–144, doi:10.1016/S0003-9861(02)00715-4.
- McCarty MF (2013) Expression and/or activity of the SVCT2 ascorbate transporter may be decreased in many aggressive cancers, suggesting potential utility for sodium bicarbonate and dehydroascorbic acid in cancer therapy. *Med Hypotheses* **81**: 664–670, doi:10.1016/j.mehy.2013.07.023.
- McCarty MF, Contreras F (2014) Increasing superoxide production and the labile iron pool in tumor cells may sensitize them to extracellular ascorbate. *Front Oncol* **4**: 249, doi:10.3389/fonc.2014.00249.
- McCormick W (1959) Cancer: a collagen disease, secondary to a nutritional deficiency? *Arch Pediatr* **76**: 166–171.
- McCormick WJ (1952) Ascorbic acid as a chemotherapeutic agent. *Arch Pediatr* **69**: 151–155.
- McDermott U, Longley DB, Galligan L, Allen W, Wilson T, Johnston PG (2005) Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Res* **65**: 8951–8960, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0961.
- McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL (2005) Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr* **25**: 261–295, doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092633.
- Mcmaster MC (2007) HPLC A Practical User ' s Guide (New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.).
- Mehmood RK (2014) Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncol Rev* **8**: 36–43, doi:10.4081/oncol.2014.256.
- Meyer VR (2010) Practical High-Performance Liquid Chromatography (Padstow: John Wiley & Sons, Ltd.).
- Mikirova NA, Casciari JJ, Riordan NH (2010) Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo. *J Angiogenes Res* **2**: 1–6, doi:10.1186/2040-2384-2-2.
- Mikirova NA, Ichim TE, Riordan NH (2008) Anti-angiogenic effect of high doses of ascorbic acid.

- J Transl Med* **6**: 1–10, doi:10.1186/1479-5876-6-50.
- Mikirova N, Casciari J, Hunninghake R, Riordan N (2013) Intravenous ascorbic acid protocol for cancer patients : scientific rationale , pharmacology , and clinical experience. *Funct Foods Heal Dis* **3**: 344–366.
- Miyata Y, Koga S, Nishikido M, Hayashi T, Kanetake H (2001) Relationship between serum ferritin levels and tumour status in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int* **88**: 974–977.
- Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET, Rubin J, O’Connell MJ, Ames MM (1985) High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med* **312**: 137–141, doi:10.1056/NEJM198501173120301.
- Monti DA, Mitchell E, Bazzan AJ, Littman S, Zabrecky G, Yeo CJ, Pillai M V, Newberg AB, Deshmukh S, Levine M (2012) Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLoS One* **7**: e29794, doi:10.1371/journal.pone.0029794.
- Moser JC, Rawal M, Wagner BA, Du J, Cullen JJ, Buettner GR (2013) Pharmacological ascorbate and ionizing radiation (IR) increase labile iron in pancreatic cancer. *Redox Biol* **2**: 22–27, doi:10.1016/j.redox.2013.11.005.
- Al Moundhri MS, Al-Salam S, Al Mahrouqee A, Beegam S, Ali BH (2013) The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies. *J Med Toxicol* **9**: 25–33, doi:10.1007/s13181-012-0239-x.
- Nagy G, Koncz A, Fernandez D, Perl A (2007) Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. *Free Radic Biol Med* **42**: 1625–1631, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.026.
- Nannizzi S, Veal GJ, Giovannetti E, Mey V, Ricciardi S, Ottley CJ, Del Tacca M, Danesi R (2010) Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**: 547–558, doi:10.1007/s00280-009-1195-2.
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 3448–3459, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
- Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M (2009) High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res* **29**: 809–815.
- Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**: 23–29, doi:10.1038/nprot.2006.5.
- Olney KE, Du J, van ’t Erve TJ, Witmer JR, Sibenaller ZA, Wagner BA, Buettner GR, Cullen JJ (2013) Inhibitors of hydroperoxide metabolism enhance ascorbate-induced cytotoxicity. *Free Radic Res* **47**: 154–163, doi:10.3109/10715762.2012.755263.

- Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 359–371, doi:10.1038/nrm1911.
- Oostendorp LJM, Stalmeier PF, Pasker-de Jong PC, Van der Graaf WT, Ottevanger PB (2010) Systematic review of benefits and risks of second-line irinotecan monotherapy for advanced colorectal cancer. *Anticancer Drugs* **21**: 749–758, doi:10.1097/CAD.0b013e32833c57cf.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 143–183, doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122.
- Packer L, Traber MG, Kraemer K, Frei B (2002) *The Antioxidant Vitamins C and E* (Illinois: AOCS Press).
- Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M (2006) Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ* **174**: 937–942, doi:10.1503/cmaj.050346.
- Padayatty SJ, Sun AY, Chen Q, Espey MG, Drisko J, Levine M (2010) Vitamin C: intravenous use by complementary and alternative medicine practitioners and adverse effects. *PLoS One* **5**: e11414, doi:10.1371/journal.pone.0011414.
- Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M (2004) Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* **140**: 533–537.
- Pagé EL, Chan DA, Giaccia AJ, Levine M, Richard DE (2008) Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell* **19**: 86–94, doi:10.1091/mbc.E07-06-0612.
- Pan M-H, Lai C-S, Wu J-C, Ho C-T (2011) Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res* **55**: 32–45, doi:10.1002/mnfr.201000412.
- Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013) Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: 1–24.
- Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinavar F, Slamon D (1999) Inhibitory effects of combinations of HER-2 / neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* **18**: 2241–2251.
- Perego P, Robert J (2016) Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol* **77**: 5–18, doi:10.1007/s00280-015-2901-x.
- Perl A, Gergely P, Nagy G, Koncz A, Banki K (2004) Mitochondrial hyperpolarization: A checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol* **25**: 360–367, doi:10.1016/j.it.2004.05.001.

- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 83–94, doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.012.
- Pires AS (2008) Citotoxicidade da vitamina C em células tumorais - Estudos in vitro e in vivo através de métodos bioúimicos e de imagiologia nuclear. Universidade de Coimbra.
- Pires AS, Marques CR, Encarnação JC, Abrantes AM, Mamede AC, Laranjo M, Gonçalves AC, Sarmento-Ribeiro AB, Botelho MF (2016) Ascorbic acid and colon cancer: an oxidative stimulus to cell death depending on cell profile. *Eur J Cell Biol* **95**: 208–218, doi:10.1016/j.ejcb.2016.04.001.
- Pollard HB, Levine MA, Eidelman O, Pollard M (2010) Pharmacological ascorbic acid suppresses syngeneic tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer. *In Vivo (Brooklyn)* **24**: 249–255, doi:24/3/249 [pii].
- Prasad KN, Kumar a, Kochupillai V, Cole WC (1999) High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. *J Am Coll Nutr* **18**: 13–25.
- Priolli DG, Abrantes AM, Neves S, Batista JN, Cardinali IA, Botelho MF (2012) A novel model of distal colon cancer in athymic mice. *Acta Cir Bras* **27**: 355–360, doi:10.1590/S0102-86502012000600001.
- Puskas F, Gergely P, Banki K, Perl A (2000) Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J* **14**: 1352–1361, doi:10.1096/fj.14.10.1352.
- Ranzato E, Biffo S, Burlando B (2011) Selective ascorbate toxicity in malignant mesothelioma: a redox Trojan mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**: 108–117, doi:10.1165/rcmb.2009-0340OC.
- Rausch SM, Winegardner F, Kruk KM, Phatak V, Wahner-Roedler DL, Bauer B, Vincent A (2011) Complementary and alternative medicine: use and disclosure in radiation oncology community practice. *Support Care Cancer* **19**: 521–529, doi:10.1007/s00520-010-0846-5.
- Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E (2002) Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* **1**: 227–235.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* **22**: 659–661, doi:10.1096/fj.07-9574LSF.
- Reed JC (2006) Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* **13**: 1378–1386, doi:10.1038/sj.cdd.4401975.
- Reed JC (2008) Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* **111**: 3322–3330, doi:10.1182/blood-2007-09-078162.
- Rhee SG, Chang T-S, Jeong W, Kang D (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells* **29**: 539–549,



doi:10.1007/s10059-010-0082-3.

- Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singletary SE (2000) Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *J Clin Oncol* **18**: 2505–2514.
- Riethmüller M, Burger N, Bauer G (2015) Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling. *Redox Biol* **6**: 157–168, doi:10.1016/j.redox.2015.07.006.
- Riordan HD, Casciari JJ, González MJ, Riordan NH, Miranda-Massari JR, Taylor P, Jackson JA (2005) A pilot clinical study of continuous intravenous ascorbate in terminal cancer patients. *P R Health Sci J* **24**: 269–276.
- Riordan HD, Hunninghake RB, Riordan NH, Jackson JJ, Meng X, Taylor P, Casciari JJ, González MJ, Miranda-Massari JR, Mora EM, Rosario N, Rivera A (2003) Intravenous ascorbic acid: protocol for its application and use. *P R Health Sci J* **22**: 287–290.
- Riordan NH, Riordan HD, Meng X, Li Y, Jackson JA (1995) Intravenous ascorbate as a tumor cytotoxic chemotherapeutic agent. *Med Hypotheses* **44**: 207–213.
- Rivas CI, Zúñiga F a, Salas-Burgos a, Mardones L, Ormazabal V, Vera JC (2008) Vitamin C transporters. *J Physiol Biochem* **64**: 357–375.
- Rivière J, Ravanat J-L, Wagner JR (2006) Ascorbate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med* **40**: 2071–2079, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.003.
- Roomi M., House D, Eckert-Maksić M, Maksić Z., Tsao C. (1998) Growth suppression of malignant leukemia cell line in vitro by ascorbic acid (vitamin C) and its derivatives. *Cancer Lett* **122**: 93–99, doi:10.1016/S0304-3835(97)00376-5.
- Rothenberg ML (2001) Irinotecan (CPT-11): Recent developments and future directions-colorectal cancer and beyond. *Oncologist* **6**: 66–80, doi:10.1634/theoncologist.6-1-66.
- Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S (2014) Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol* **87**: 150–161, doi:10.1016/j.bcp.2013.06.020.
- Sadowska-Bartosz I, Bartosz G (2015) Ascorbic acid and protein glycation in vitro. *Chem Biol Interact* **240**: 154–162, doi:10.1016/j.cbi.2015.07.006.
- Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E (2009) Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Natl Cancer Inst* **101**: 1543–1552, doi:10.1093/jnci/djp328.
- Savini I, Rossi a, Pierro C, Avigliano L, Catani M V (2008) SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* **34**: 347–355, doi:10.1007/s00726-007-0555-7.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:

343–354, doi:10.1038/nrm1366.

- Serrano OK, Parrow NL, Violet P-C, Yang J, Zornjak J, Basseville A, Levine M (2015) Antitumor effect of pharmacologic ascorbate in the B16 murine melanoma model. *Free Radic Biol Med* **87**: 193–203, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.032.
- Shaghghi MA, Kloss O, Eck P (2016) Genetic variation in human vitamin C transporter genes in common complex diseases. *Adv Nutr* **7**: 287–298, doi:10.3945/an.115.009225.
- Shariat SZAS, Mostafavi SA, Khakpour F (2013) Antioxidant effects of vitamins C and E on the low-density lipoprotein oxidation mediated by myeloperoxidase. *Iran Biomed J* **17**: 22–38, doi:10.6091/ibj.1092.2012.
- Shinozaki K, Hosokawa Y, Hazawa M, Kashiwakura I, Okumura K, Kaku T, Nakayama E (2011) Ascorbic acid enhances radiation-induced apoptosis in an HL60 human leukemia cell line. *J Radiat Res* **52**: 229–237, doi:10.1269/jrr.10089.
- Siegel R, Jemal A (2014) Colorectal cancer facts & figures 2014-2016 (Atlanta).
- Sinnberg T, Noor S, Venturelli S, Berger A, Schuler P, Garbe C, Busch C (2014) The ROS-induced cytotoxicity of ascorbate is attenuated by hypoxia and HIF-1alpha in the NCI60 cancer cell lines. *J Cell Mol Med* **18**: 530–541, doi:10.1111/jcmm.12207.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**: 1107–1112.
- Society AC (2016) Treatment of colon cancer, by stage <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-treating-by-stage-colon> (accessed: 18/08/2016).
- Sooryakumar D, Dexheimer TS, Teicher BA, Pommier Y (2011) Molecular and cellular pharmacology of the novel noncamptothecin topoisomerase I inhibitor Genz-644282. *Mol Cancer Ther* **10**: 1490–1499, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1043.
- Stephen R, Utecht T (2001) Scurvy identified in the emergency department: A case report. *J Emerg Med* **21**: 235–237, doi:10.1016/S0736-4679(01)00377-8.
- Straetemans R, O'Brien T, Wouters L, Van Dun J, Janicot M, Bijmens L, Burzykowski T, Aerts M (2005) Design and analysis of drug combination experiments. *Biom J* **47**: 299–308, doi:10.1002/bimj.200410124.
- Straub TM, Hutchison JR, Bartholomew RA, Valdez CO, Valentine NB, Dohnalkova A, Ozanich RM, Bruckner-Lea CJ (2013) Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Sci Technol* **67**: 863–868, doi:10.2166/wst.2012.636.
- Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X (2011) p53 signaling and autophagy in cancer: A revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy* **7**: 565–571, doi:10.4161/auto.7.6.14073.
- Sun Y, Peng Z-L (2009) Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J* **85**: 134–140,

- doi:10.1136/pgmj.2008.072629.
- Svirbely JL, Szent-Györgyi A (1932) The chemical nature of vitamin C. *Biochem J* **26**: 865–870, doi:10.1126/science.75.1944.357-a.
- Svirbely JL, Szent-Györgyi A (1933) The chemical nature of vitamin C. *Biochem J* **27**: 279–285.
- Takara K, Sakaeda T, Yagami T, Kobayashi H, Ohmoto N, Horinouchi M, Nishiguchi K, Okumura K (2002) Cytotoxic effects of 27 anticancer drugs in HeLa and MDRI-overexpressing derivative cell lines. *Biol Pharm Bull* **25**: 771–778, doi:10.1248/bpb.25.771.
- Takemura Y, Satoh M, Satoh K, Hamada H, Sekido Y, Kubota S (2010) High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 249–253, doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.012.
- Tamas K, Walenkamp AME, de Vries EGE, van Vugt MATM, Beets-Tan RG, van Etten B, de Groot DJA, Hospers GAP (2015) Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev* **41**: 671–679, doi:10.1016/j.ctrv.2015.06.007.
- Traber MG, Stevens JF (2011) Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* **51**: 1000–1013, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017.
- Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger U V, Chen X, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA (1999) A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**: 2–7.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**: 335–344, doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Uetaki M, Tabata S, Nakasuka F, Soga T, Tomita M (2015) Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Sci Rep* **5**: 1–9, doi:10.1038/srep13896.
- UK CR (2015) Cancer Research UK statistics <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer/incidence#heading-Three> (accessed: 18/08/2016).
- Ullah MF, Khan HY, Zubair H, Shamim U, Hadi SM (2011) The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: Implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **67**: 103–110, doi:10.1007/s00280-010-1290-4.
- Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P (2013) The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther* **137**: 318–330, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.11.003.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants

- in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**: 1–40, doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Vallabhajosula S, Killeen RP, Osborne JR (2010) Altered biodistribution of radiopharmaceuticals: role of radiochemical/pharmaceutical purity, physiological, and pharmacologic factors. *Semin Nucl Med* **40**: 220–241, doi:10.1053/j.semnuclmed.2010.02.004.
- Varma S, Sobey K, Campbell CE, Kuo SM (2009) Hierarchical contribution of N- and C-terminal sequences to the differential localization of homologous sodium-dependent vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochemistry* **48**: 2969–2980, doi:10.1021/bi802294v.
- Vaseva A V., Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM (2012) P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* **149**: 1536–1548, doi:10.1016/j.cell.2012.05.014.
- Venturelli S, Sinnberg TW, Niessner H, Busch C (2015) Molecular mechanisms of pharmacological doses of ascorbate on cancer cells. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **165**: 251–257, doi:10.1007/s10354-015-0356-7.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**: 167–190.
- Verrax J, Cadrobbi J, Marques C, Taper H, Habraken Y, Piette J, Calderon PB (2004) Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. *Apoptosis* **9**: 223–233, doi:10.1023/B:APPT.0000018804.26026.1a.
- Verrax J, Calderon PB (2009) Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radic Biol Med* **47**: 32–40, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.016.
- Verrax J, Delvaux M, Beghein N, Taper H, Gallez B, Buc Calderon P (2005) Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An in vitro comparative study. *Free Radic Res* **39**: 649–657, doi:10.1080/10715760500097906.
- Verrax J, Taper H, Buc Calderon P (2008) Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy. *Curr Mol Pharmacol* **1**: 80–92.
- Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* **1**: 1112–1116, doi:10.1038/nprot.2006.179.
- Vissers MCM, Gunningham SP, Morrison MJ, Dachs GU, Currie MJ (2007) Modulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cultured primary cells by intracellular ascorbate. *Free Radic Biol Med* **42**: 765–772, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.023.
- Voigt W (2005) Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* **110**: 39–48, doi:10.1385/1-59259-869-2:039.

- Vollbracht C, Schneider B, Leendert V, Weiss G, Auerbach L, Beuth J (2011) Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. *In Vivo* **25**: 983–990.
- Wagner LM (2015) Fifteen years of irinotecan therapy for pediatric sarcoma: where to next? *Clin Sarcoma Res* **5**: 1–7, doi:10.1186/s13569-015-0035-x.
- Wang S, Cao S, Wu R, Chi F, Tang M, Jin X, Chen X (2015a) Serum ferritin predicted prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Futur Oncol* **11**: 2905–2910, doi:10.2217/fon.15.186.
- Wang X, Simpson ER, Brown KA (2015b) p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res* **75**: 1–8, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0563.
- Weekes J, Lam AK-Y, Sebesan S, Ho Y-H (2009) Irinotecan therapy and molecular targets in colorectal cancer: a systemic review. *World J Gastroenterol* **15**: 3597–3602.
- Wei Y, Song J, Chen Q, Xing D (2012) Enhancement of photodynamic antitumor effect with pro-oxidant ascorbate. *Lasers Surg Med* **44**: 69–75, doi:10.1002/lsm.21157.
- Weidinger A, Kozlov A V (2015) Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* **5**: 472–484, doi:10.3390/biom5020472.
- Welsh JL, Wagner BA, van't Erve TJ, Zehr PS, Berg DJ, Halfdanarson TR, Yee NS, Bodeker KL, Du J, Roberts LJ, Drisko J, Levine M, Buettner GR, Cullen JJ (2013) Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): results from a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol* **71**: 765–775, doi:10.1007/s00280-013-2070-8.
- Williams GH, Stoeber K (2012) The cell cycle and cancer. *J Pathol* **226**: 352–364, doi:10.1002/path.3022.
- Wilson JX (2005) Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* **25**: 105–125, doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092647.
- Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP (2014) Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia Pac J Clin Oncol* **10**: 22–37, doi:10.1111/ajco.12173.
- Wolpin BM, Mayer RJ (2008) Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* **134**: 1296–1310, doi:10.1053/j.gastro.2008.02.098.
- Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MC, Arnett B, Chapman WG, Trevino a V, Raymond E, Chaney SG, Vaisman a, Varchenko M, Juniewicz PE (2000) Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol* **58**: 920–927.
- Yang W, Shi L, Chen L, Zhang B, Ma K, Liu Y, Qian Y (2014) Protective effects of perindopril on d-galactose and aluminum trichloride induced neurotoxicity via the apoptosis of

- mitochondria-mediated intrinsic pathway in the hippocampus of mice. *Brain Res Bull* **109**: 46–53, doi:10.1016/j.brainresbull.2014.09.010.
- 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. *Biol Pharm Bull* **31**: 592–597.
- Yeh KH, Yeh SH, Hsu CH, Wang TM, Ma IF, Cheng a L (2000) Prolonged and enhanced suppression of thymidylate synthase by weekly 24-h infusion of high-dose 5-fluorouracil. *Br J Cancer* **83**: 1510–1515, doi:10.1054/bjoc.2000.1456.
- Yeom CH, Jung GC, Song KJ (2007) Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *J Korean Med Sci* **22**: 7–11, doi:10.3346/jkms.2007.22.1.7.
- Yeom C-H, Lee G, Park J-H, Yu J, Park S, Yi S-Y, Lee HR, Hong YS, Yang J, Lee S (2009) High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis. *J Transl Med* **7**: 1–9, doi:10.1186/1479-5876-7-70.
- Yiu AJ, Yiu CY (2016) Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* **36**: 1093–1102.
- Young A, Hobbs R, Kerr D (2011) ABC of Colorectal Cancer (Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.).
- Zanardelli M, Micheli L, Nicolai R, Failli P, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L (2015) Different apoptotic pathways activated by oxaliplatin in primary astrocytes vs. colo-rectal cancer cells. *Int J Mol Sci* **16**: 5386–5399, doi:10.3390/ijms16035386.
- Zanoni JN, Lucas NM, Trevizan AR, Souza IDS (2013) Histological evaluation of the periodontal ligament from aged Wistar rats supplemented with ascorbic acid. *An Acad Bras Cienc* **85**: 327–335.
- Zetterström R (2009) Nobel prize 1937 to Albert von Szent-Györgyi: Identification of vitamin C as the anti-scorbutic factor. *Acta Paediatr Int J Paediatr* **98**: 915–919, doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01239.x.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS (2008) 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* **13**: 1551–1569, doi:10.3390/molecules13081551.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* **34**: 1359–1368, doi:10.1016/S0891-5849(03)00142-4.

PARTE V

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS





---

5-FU	5-fluorouracilo
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Pertecnetato livre
$^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$	Pertecnetato de sódio
$^{99m}\text{Tc-RH}$	Tecnécio reduzido-hidrolisado não ligado
AA	Ácido ascórbico
$\text{AA}^-$	Monoânion ascorbato
$\text{AA}^\cdot$	Radical ascorbil
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis colis gene</i>
APCy	<i>Allophycocyanin</i>
$\text{Asc}^{2-}$	Dianião ascorbato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AV	Anexina V
BAD	<i>BCL-2-associated death promoter protein</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer protein</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra-large protein</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist protein</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>

BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAPS	<i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	<i>Chromosomal instability</i>
CMS	<i>Consensus molecular subtypes</i>
CPS	Contagens por segundo
CRCSC	<i>Colorectal Cancer Subtyping Consortium</i>
CypD	<i>Cyclophilin D</i>
DACH	<i>1,2-diaminocyclohexane</i>
DCF	<i>2',7'- dichlorofluorescein</i>
DCFH	<i>2',7'- dichlorodihydrofluorescein</i>
DCFH <sub>2</sub> -DA	<i>2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DHA	Ácido dehidroascórbico
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DHFU	<i>Dihydrofluorouracil</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPD	<i>Dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
dTMP	<i>Deoxythymidine monophosphate</i>
DTT	<i>DL-dithiothreitol</i>
dUMP	<i>Deoxyuridine monophosphate</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>

---

FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FdUMP	<i>Fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
FdUTP	<i>Fluorodeoxyuridine triphosphate</i>
Fe <sup>2+</sup>	Íão ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Íão férrico
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FS	Fator de sobrevivência
FUTP	<i>Fluorouridine triphosphate</i>
G6PD	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GS <sup>•</sup>	Radical tiol
GSH	Glutaciona reduzida
GV	Glóbulos vermelhos
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math></i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
i.v.	Intravenosa
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBD	<i>Inflammatory bowel diseases</i>
IC	Índice de combinação
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
ICD	<i>Immunogenic cell death</i>
IP	Iodeto de propídeo
IRI	Irinotecano
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolocarboyanine iodide</i>
Km	Concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima

KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LOO <sup>•</sup>	Radical peroxilo
LPO	<i>Lipid peroxidation</i>
LV	Leucovorina
MAC	<i>Modified Astler-Coller classification</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCL-1	<i>Myeloid cell leukemia</i>
MIF	Média das intensidades de fluorescência
MMR	<i>Mismatch repair complex</i>
MPO	Mieloperoxidase
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
MT	Monoterapia
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADP <sup>+</sup>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen</i>
NCI60	<i>US National Cancer Institute 60 human tumour cell line anticancer drug screen</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear transcription factor kappa B</i>
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Dióxido de nitrogénio
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
O <sub>2</sub>	Oxigénio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
Omi/HtrA2	<i>High temperature requirement protein A2</i>
ONOO <sup>•</sup>	Peroxinitrito
OXA	Oxaliplatina

---

Painel NDA	<i>Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies</i>
PARP	<i>Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PGP	<i>P-glycoprotein</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PK/PD	<i>Pharmacokinetics/pharmacodynamics</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
RO <sup>•</sup>	Radical alcoxilo
ROI	<i>Regions of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SCNA	<i>Somatic copy number alterations</i>
SDS	<i>Sodium dodecil sulfate</i>
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>
SN-38G	<i>SN-38 glucoronide</i>
SOD	Superóxido dismutase
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
SVCT	<i>Sodium-dependent vitamin C transporters</i>
tBID	<i>Truncated BH3 interacting-domain death agonist</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline tween-20</i>
TC	Terapia combinada
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>

TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TNM	<i>Tumor node metastasis</i>
TO $\cdot$	Radicais tocoferoxilo
TocH	Tocoferol
TS	<i>Thymidylate synthase</i>
UGT1A1	<i>Hepatic uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VRN	Valores de referência nutricionais
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

PARTE VI

ANEXOS





# ANEXO I



O sistema de estadiamento TNM inclui a classificação do estágio do tumor de acordo com os três critérios evidenciados na Tabela 15. A profundidade da invasão tumoral define as categorias do estágio T, a revisão dos nódulos linfáticos circundantes define as categorias do estágio N e a propagação do tumor para além do intestino e dos gânglios linfáticos regionais define as categorias do estágio M (Labianca *et al*, 2013).

Tabela 15: Sistema de classificação de estadiamento AJCC/UICC TNM (7ª edição) para o cancro do cólon (Labianca *et al*, 2013; Cancer, 2015)

<i>Tumor Primário (T)</i>	
<b>TX</b>	Tumor primário inacessível
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial (confinado à membrana basal glandular) ou intramucosal (invasão da <i>lamina propria</i> )
<b>T1</b>	Tumor invade a submucosa
<b>T2</b>	Tumor invade a <i>muscularis propria</i>
<b>T3</b>	Tumor invade os tecidos pericólicas através da <i>muscularis propria</i>
<b>T4a</b>	Tumor penetra a superfície do peritoneu visceral
<b>T4b</b>	Tumor invade ou está aderente a outros órgãos ou estruturas
<i>Gânglios linfáticos regionais (N)</i>	
<b>NX</b>	Gânglios linfáticos regionais inacessíveis
<b>N0</b>	Sem metástases em gânglios linfáticos regionais
<b>N1</b>	Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos regionais
<b>N1a</b>	Metástases em 1 gânglio linfático regional
<b>N1b</b>	Metástases em 2 a 3 gânglios linfáticos regionais
<b>N1c</b>	Depósito(s) de tumor na subserosa ou em tecidos não peritonealizados
<b>N2</b>	Metástases em 4 ou mais gânglios linfáticos regionais (a: 4-6, b: ≥7)
<i>Metástases à distância (M)</i>	
<b>M0</b>	Sem metástases à distância
<b>M1</b>	Metástases à distância
<b>M1a</b>	Metástases confinadas a um órgão ou local (p. ex. fígado, pulmão, ovário, nódulo não-regional)
<b>M1b</b>	Metástases em mais do que um órgão/local ou no peritoneu



## ANEXO II



Com o presente trabalho identificámos três possíveis mecanismos de ação da vitamina C na célula tumoral, esquematizados na Figura 72, na Figura 73 e na Figura 74.

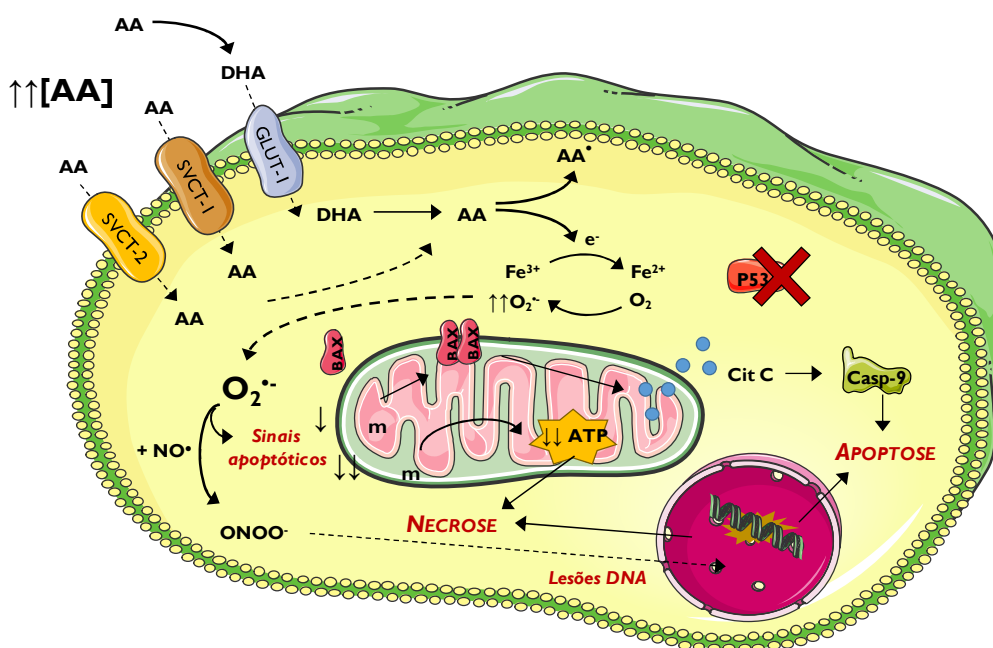


Figura 72: Esquema representativo do mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células C2BBel. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*). Legenda: AA, ácido ascórbico; DHA, ácido dehidroascórbico; GLUT-1, transportador GLUT-1; SVCT-1, transportador SVCT-1; SVCT-2, transportador SVCT-2; AA•, radical ascorbil; e<sup>-</sup>, eletrão; Fe<sup>3+</sup>, ião férrico; Fe<sup>2+</sup>, ião ferroso; O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, radical superóxido; m, potencial de membrana mitocondrial; BAX, proteína BAX; Cit C, citocromo C; Casp-9, caspase-9; ATP, adenosina trifosfato; NO•, óxido nítrico; ONOO•, peroxinitrito; P53, proteína P53.





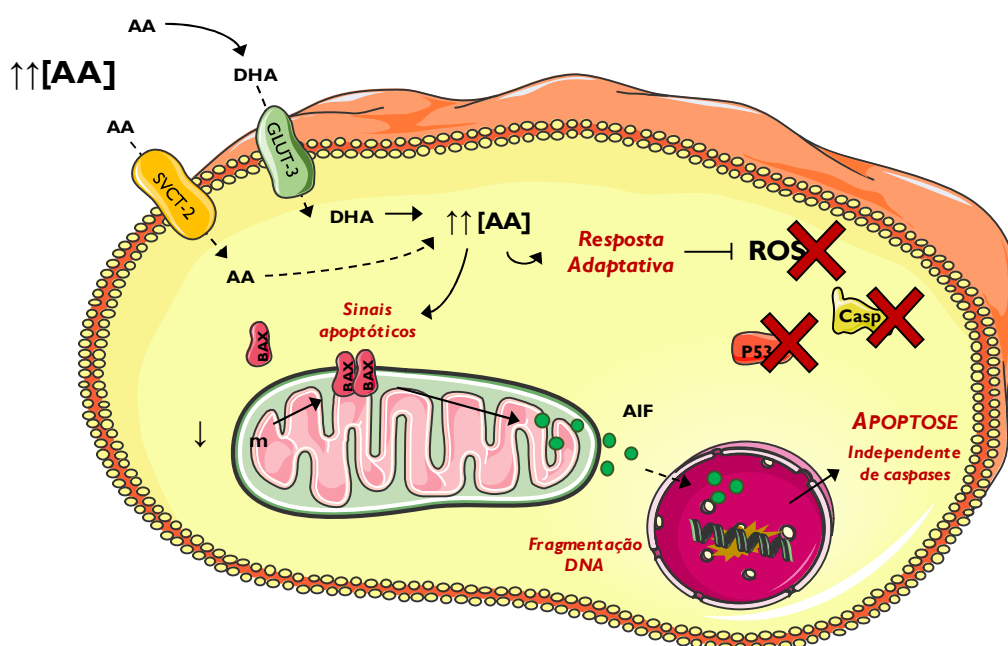


Figura 73: Esquema representativo do mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células LS1034. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*). Legenda: AA, ácido ascórbico; DHA, ácido deidroascórbico; GLUT-3, transportador GLUT-3; SVCT-2, transportador SVCT-2; ROS, espécies reativas de oxigênio;  $\psi_m$ , potencial de membrana mitocondrial; BAX, proteína BAX; AIF, proteína mitocondrial indutora de apoptose; P53, proteína P53; Casp, caspases.



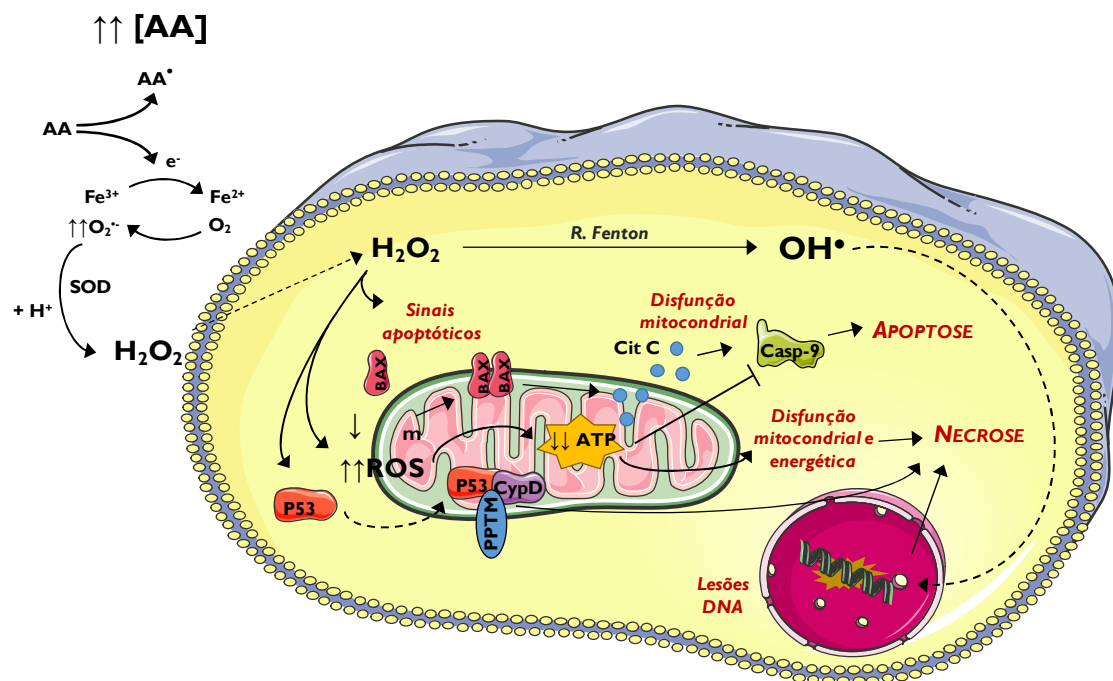


Figura 74: Esquema representativo do mecanismo de ação do ácido ascórbico nas células WiDr. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*). Legenda: AA, ácido ascórbico; AA•, radical ascorbil; e⁻, elétron; Fe³⁺, íon férrico; Fe²⁺, íon ferroso; O₂•⁻, radical superóxido; SOD, superóxido dismutase; OH•, radical hidroxila; m, potencial de membrana mitocondrial; BAX, proteína BAX; Cit C, citocromo C; Casp-9, caspase-9; ROS, espécies reativas de oxigênio; ATP, adenosina trifosfato; P53, proteína P53; Cyp D, ciclopilina D; PPTM, poro de permeabilidade transitória mitocondrial.



## PARTE VII

### PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM A TESE



### Artigos publicados em revistas com arbitragem científica

- 1 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Abrantes, AM; Mamede, AC; Laranjo, M; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and colon cancer: an oxidative stimulus to cell death depending on cell profile. *European Journal of Cell Biology*, v. 95, n. 6-7, p. 208-218, 2016. Com arbitragem científica.
- 2 Mamede, AC; Abrantes, AM; Pires, AS; Tavares, SD; Serra, ME; Maia, JM; Botelho, MF. Radiolabelling of ascorbic acid: A new clue to clarify its action as an anticancer agent? *Current Radiopharmaceuticals*, v. 5, n. 2, p. 106-112, 2012. Com arbitragem científica.
- 3 Mamede, AC; Pires, AS; Abrantes, AM; Tavares, SD; Gonçalves, AC; Casalta-Lopes, JE; Sarmiento-Ribeiro, AB; Maia, JM; Botelho, MF. Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrition and Cancer*, v. 64, n. 7, p. 1049-1057, 2012. Com arbitragem científica.

### Resumos publicados em revistas com arbitragem científica

- 1 Pires, AS. Pharmacological ascorbic acid chemosensitizes colorectal cancer cells and synergistically inhibits tumor growth. In: 2ND ASPIC INTERNATIONAL CONGRESS, 2016. Porto. 2nd ASPIC International Congress Proceedings Book. 2016, p. 35-36.
- 2 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and conventional chemotherapeutic agents synergistically inhibit colorectal cancer cells proliferation and tumor growth. In: EACR'24 BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2016. Manchester. *European Journal of Cancer*. 2016, v. 61, p. S114-S115.
- 3 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and conventional chemotherapeutic agents synergistically inhibit colorectal cancer cells proliferation and tumor growth. In: 5º CONGRESSO DO CIMAGO, 2016. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2016.
- 4 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid-induced cytotoxicity in three colon cancer cell lines. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA 2015 - 4.º CONGRESSO DO CIMAGO, 2015. Coimbra. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2015.
- 5 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Efeito sinérgico entre o ácido ascórbico e a quimioterapia convencional no tratamento do cancro do cólon. In: SEMANA DIGESTIVA 2014, 2014. Estoril. Suplemento do GE - *Jornal Português de Gastreenterologia*. 2014.
- 6 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and 5-Fluorouracil act synergistically against three different

- colon carcinoma cell lines. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA 2014 - 3.º CONGRESSO DO CIMAGO, 2014. Coimbra. Revista Portuguesa de Pneumologia. 2014.
- 7 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid-induced cytotoxicity in colon cancer cell lines. In: EACR'23 BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2014. Munique. European Journal of Cancer. 2014, v. 50, p. 182.
  - 8 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid-induced cytotoxicity in three colon cancer cell lines. In: EACR'23 BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2014. Munich. European Journal of Cancer. 2014, v. 50, p. 182.
  - 9 Pires, AS; Marques, CR; Almeida, AR; Mamede, AC; Abrantes, AM; Tralhão, JG; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Is there a true correlation between cytotoxic effect and uptake of ascorbic acid in colorectal cancer cells? In: EANM'13 - ANNUAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE, 2013. Lyon. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2013, v. 40, p. 349-350.
  - 10 Pires, AS; Marques, CR; Mamede, AC; Abrantes, AM; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and its cytotoxic effect in melanoma: in vitro and in vivo studies. In: ACTUALIZAÇÕES EM ONCOLOGIA 2013 - 2.º CONGRESSO DO CIMAGO, 2013. Coimbra. Revista Portuguesa de Pneumologia. 2013, v. 19, p. 1-8.
  - 11 Marques, CR; Pires, AS; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Is there a synergistic effect between ascorbic acid and conventional chemotherapy in the treatment of colorectal carcinoma? In: EUROPEAN CANCER CONGRESS (ECCO17 - ESMO38 - ESTRO32), 2013. Amesterdão. European Journal of Cancer. 2013, v. 49, p. 496-497.
  - 12 Almeida, AR; Pires, AS; Marques, CR; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and colon carcinoma: correlation between uptake and cytotoxic effect. In: EUROPEAN CANCER CONGRESS (ECCO17 - ESMO38 - ESTRO32), 2013. Amsterdão. European Journal of Cancer. 2013, v. 49, p. 497.
  - 13 Pires, AS; Mamede, AC; Silva, VS; Abrantes, AM; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid effect in two different cell lines of colorectal adenocarcinoma: in vitro and in vivo studies. In: EACR'22 BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2012. Barcelona. European Journal of Cancer. 2012, v. 48, p. 76-77.
  - 14 Pires, AS; Mamede, AC; Silva, VS; Abrantes, AM; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid and its therapeutic potential against colorectal adenocarcinoma. In: ESMO 14TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2012. Barcelona. Annals of Oncology. 2012, v. 23, p. 90.
  - 15 Pires, AS; Mamede, AC; Silva, VS; Abrantes, AM; Casalta-Lopes, JE; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid: what is its therapeutic potential against colorectal adenocarcinoma? In: WORLD MOLECULAR IMAGING CONGRESS (EMIM 2012 / WMIC 2012), 2012. Dublin. Molecular Imaging and Biology. 2012.
  - 16 Pires, AS; Mamede, AC; Abrantes, AM; Brito, AF; Laranjo, M; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF.



The in vitro and in vivo effect of ascorbic acid in a melanoma cell line: a new mechanism of action? In: TAT 2012 - 10TH INTERNATIONAL CONGRESS ON TARGETED ANTICANCER THERAPIES, 2012. Amsterdão. *Annals of Oncology*. 2012, v. 23, p. 29.

- 17 Pires, AS; Mamede, AC; Abrantes, AM; Matos, CC; Brito, AF; Casalta-Lopes, JE; Laranjo, M; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Chemotherapy or radiotherapy plus ascorbic acid: a synergic effect against colorectal adenocarcinoma? In: ESMO 13TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER, 2011. Barcelona. *Annals of Oncology*. 2011, v. 22, p. 115.

### Comunicações orais ou sob a forma de poster

- 1 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Rocha-Gonsalves, AM. Ascorbic acid and 5-Fluorouracil act synergistically against three different Colon Carcinoma cell lines. 28<sup>a</sup> Atualizações em Oncologia - 3<sup>o</sup> Congresso do CIMAGO (Coimbra, Portugal, Janeiro 2014). Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 2 Pires, AS; Fernandes, S; Encarnação, JC; Casalta-Lopes, JE; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Combination of vitamin C and irinotecan as a potential treatment against colon cancer. 1st ASPIC International Congress. Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 3 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF; Tralhão, JG; Castro-Sousa, F. Efeito sinérgico entre o ácido ascórbico e a quimioterapia convencional no tratamento do cancro do cólon. XXXIV Congresso Nacional de Cirurgia. Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Comunicação).
- 4 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Efeito sinérgico entre o ácido ascórbico e a quimioterapia convencional no tratamento do cancro do cólon. Semana Digestiva 2014 (Estoril, Portugal, Junho de 2014). Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 5 Pires, AS; Fernandes, S; Encarnação, JC; Casalta-Lopes, JE; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid as an enhancer of irinotecan effect in the treatment of colon cancer. VI Annual Meeting of IBILI. Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 6 Santos, GB; Pires, AS; Encarnação, JC; Casalta-Lopes, JE; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Vitamin c and oxaliplatin: a potential synergistic effect against colon carcinoma. Yes Meeting 2014 - 9th Young European Scientist Meeting. Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 7 Pires, AS; Fernandes, S; Encarnação, JC; Casalta-Lopes, JE; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Combination of vitamin C and irinotecan as a potential treatment against colon cancer. XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society (SPB). Portugal. 2014. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 8 Pires, AS; Marques, CR; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Gonçalves, AC; Abrantes,

- AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Is there a synergistic effect between ascorbic acid and conventional chemotherapy in the treatment of colorectal carcinoma? 4th PF2MUC Symposium. Portugal. 2013. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 9 Marques, CR; Pires, AS; Encarnação, JC; Gonçalves, TJ; Mamede, AC; Casalta-Lopes, JE; Abrantes, AM; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid: does it have therapeutic potential against colorectal adenocarcinoma? Ist reSEARCH Coimbra. Portugal. 2013. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 10 Pires, AS; Marques, CR; Mamede, AC; Abrantes, AM; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid has a cytotoxic effect in a melanoma cell line. IV Annual Meeting of IBILI. Portugal. 2012. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 11 Pires, AS; Mamede, AC; Silva, VS; Abrantes, AM; Casalta-Lopes, JE; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid: what is its therapeutic potential against colorectal adenocarcinoma? 2nd PF2MUC Symposium. Portugal. 2012. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 12 Pires, AS; Mamede, AC; Abrantes, AM; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid: is it a therapeutic agent against colorectal adenocarcinoma? Actualizações em Oncologia 2012 - 1.º Congresso do CIMAGO. 2012. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 13 Pires, AS; Mamede, AC; Marques, CR; Abrantes, AM; Gonçalves, AC; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. Ascorbic acid decreases cell viability in a melanoma cell line. A one day symposium with Carlos Caldas. Portugal. 2012. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 14 Mamede, AC; Abrantes, AM; Pires, AS; Maia, JM; Botelho, MF. Citotoxicidade selectiva da vitamina C em células tumorais: estudos in vitro e in vivo. IV Jornadas sobre Tecnologia e Saúde. Portugal. 2011. (Apresentação oral de trabalho/Comunicação).
- 15 Abrantes, AM; Mamede, AC; Pires, AS; Brito, AF; Matos, CC; Botelho, MF. Anti-proliferative effect of ascorbic acid in a melanocytic melanoma cell line: a new mechanism of action? XX Porto Cancer Meeting. 2011. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 16 Pires, AS; Mamede, AC; Abrantes, AM; Serra, ME; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. O ácido ascórbico como potencial agente imagiológico e terapêutico: estudos in vitro e in vivo numa linha celular de adenocarcinoma colorectal. XIII Congresso Nacional de Medicina Nuclear. 2011. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 17 Mamede, AC; Pires, AS; Abrantes, AM; Matos, CC; Laranjo, M; Botelho, MF. Ascorbic acid and conventional anti-cancer therapies: allies or antagonists? XX Porto Cancer Meeting. 2011. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 18 Pires, AS; Mamede, AC; Abrantes, AM; Brito, AF; Matos, CC; Botelho, MF. Cytotoxic effect of ascorbic acid in human colorectal adenocarcinoma cell line WiDr. XX Porto Cancer Meeting. 2011. (Apresentação oral de trabalho/Poster).
- 19 Pires, AS; Mamede, AC; Abrantes, AM; Matos, CC; Brito, AF; Casalta-Lopes, JE; Laranjo, M; Sarmiento-Ribeiro, AB; Botelho, MF. The effect of chemotherapy/ radiotherapy plus ascorbic acid in colorectal adenocarcinoma. III Annual Meeting of IBILI. 2011. (Apresentação oral de trabalho/Poster).

- 20 Mamede, AC; Tavares, SD; Abrantes, AM; Pires, AS; Gonçalves, AC; Serra, ME; Sarmiento-Ribeiro, AB; Maia, JM; Botelho, MF. Ascorbic acid and its potentiality as an anticancer agent: in vitro and in vivo studies in human colorectal cancer. Young European Scientist Meeting. 2010. (Apresentação oral de trabalho/Poster).





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejcb](http://www.elsevier.com/locate/ejcb)



## Ascorbic acid and colon cancer: an oxidative stimulus to cell death depending on cell profile

Ana Salomé Pires<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Cláudia Raquel Marques<sup>a,1</sup>, João Carlos Encarnação<sup>a,b</sup>,  
Ana Margarida Abrantes<sup>a,b,c</sup>, Ana Catarina Mamede<sup>a,b,c,e</sup>, Mafalda Laranjo<sup>a,b,c</sup>,  
Ana Cristina Gonçalves<sup>a,b,f</sup>, Ana Bela Sarmiento-Ribeiro<sup>a,b,f,g</sup>, Maria Filomena Botelho<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Biophysics Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal

<sup>b</sup> CIMAGO, FMUC-Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

<sup>c</sup> CNC.IBILLI, University of Coimbra, Portugal

<sup>d</sup> Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Portugal

<sup>e</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>f</sup> Oncobiology and Hematology Laboratory, Applied Molecular Biology and University Clinic of Hematology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

<sup>g</sup> Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Hematology Department, Coimbra, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 January 2016

Received in revised form 13 February 2016

Accepted 5 April 2016

#### Keywords:

Ascorbic acid

Colon cancer

Cell death mechanisms

### ABSTRACT

Colorectal cancer is a major health problem worldwide with urgent need for new and effective anti-cancer approaches that allow treating, increasing survival and improving life quality of patients. At pharmacological concentrations, ascorbic acid (AA) exerts a selective cytotoxic effect, whose mechanism of cytotoxicity remains unsolved. It has been suggested that it depends on the production of extracellular hydrogen peroxide, using ascorbate radical as an intermediate. The aim of this study was to evaluate the effects induced by AA in three colon cancer cell lines, as well as, possible cell death mechanisms involved.

Our results showed that pharmacological concentrations of AA induce anti-proliferative, cytotoxic and genotoxic effects on three colon cancer cell lines under study. We also found that AA can induce cell death by an increment of oxidative stress, but also mediating a ROS-independent mechanism, as observed in LS1034 cells. This work explores AA anti-tumoral effects and highlights its applicability in the treatment of CC, underlying the importance of proceeding to clinical trials.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

Colorectal cancer<sup>2</sup> (CRC) is a major health problem worldwide, being the third most common type in men and the second

in women, in 2012 (World Health Organization, n.d.). Progresses have been made concerning CRC treatment, increasing survival and improving the life quality of patients (Lorenzon et al., 2014). However, there is an urgent need of new and effective anti-cancer agents.

Vitamin C (ascorbic acid,<sup>3</sup> AA) is a water-soluble lactone that is obtained by the human body through exogenous sources, since humans lack the ability to synthesize this nutrient endogenously (Mamede et al., 2012a,b, 2011). AA is taken up by most cell types via a high affinity/low capacity mechanism through sodium-dependent vitamin C transporters<sup>4</sup> (SVCT-1 and -2), or as dehydroascorbic acid<sup>5</sup> (DHA), being accumulated via sodium-

*Abbreviations:* AA, ascorbic acid; CRC, colorectal cancer; DHA, dehydroascorbic acid; GLUT, glucose transporters; HIF, hypoxia inducible factor; IC<sub>50</sub>, half-maximal inhibitory concentration; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; SVCT, sodium-dependent vitamin C transporter;  $\psi_m$ , mitochondrial membrane potential.

\* Corresponding author.

*E-mail addresses:* a.salome.pires@gmail.com (A.S. Pires), claudiaraquelmarques@gmail.com (C.R. Marques), joaocrispim90@gmail.com (J.C. Encarnação), mabrantes@fmed.uc.pt (A.M. Abrantes), ana.mamede@hotmail.com (A.C. Mamede), mafaldalaranjo@gmail.com (M. Laranjo), acc.goncalves@gmail.com (A.C. Gonçalves), absarmiento@fmed.uc.pt (A.B. Sarmiento-Ribeiro), mfbotelho@fmed.uc.pt (M.F. Botelho).

<sup>1</sup> The first and second authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> CRC, colorectal cancer.

<sup>3</sup> AA, ascorbic acid.

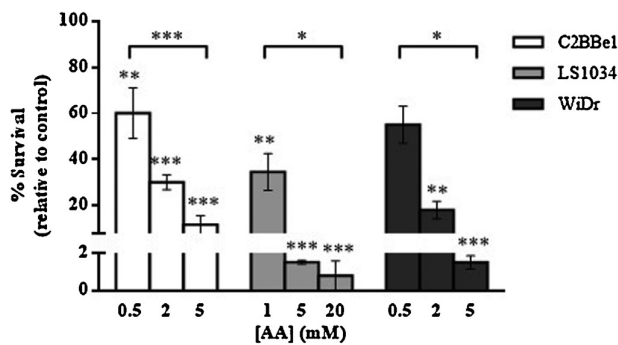
<sup>4</sup> SVCT, sodium-dependent vitamin C transporter.

<sup>5</sup> DHA, dehydroascorbic acid.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.04.001>

0171-9335/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Pires, A.S., et al., Ascorbic acid and colon cancer: an oxidative stimulus to cell death depending on cell profile. Eur. J. Cell Biol. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.04.001>



**Fig. 1.** Cell survival analysis of C2BBE1, LS1034 and WiDr cells. C2BBE1 and WiDr cells were treated with 0.5, 2 and 10 mM of AA and LS1034 cells with 1, 5 and 20 mM. Data represent the mean  $\pm$  SD in percentage relative to control of at least three independent experiments per cell line. Statistically significant differences are shown with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

independent facilitative glucose transporters<sup>6</sup> (GLUTs) followed by intracellular reduction (Azzolini et al., 2013; Du et al., 2012).

The use of high doses of intravenous AA in cancer treatment began in the 1970's (Daniel, 2011; Padayatty et al., 2006). New insights into the pharmacokinetics of intravenous and oral vitamin C show that when AA is given orally, plasma concentrations are tightly controlled at values less than 100  $\mu$ M, whereas intravenous injection bypasses the intestinal absorption system, and can yield high plasmatic levels, which may lead to tumor cytotoxicity (Daniel, 2011; Ohno et al., 2009). Meanwhile, it has also been proven that millimolar concentrations of AA are clinically achievable (Mikirova et al., 2013a,b). At pharmacological concentrations, AA exerts a selective cytotoxic effect in tumor cells comparing with normal cells. This AA's selective effect may be due to several factors: (1) decreased concentrations of antioxidant defenses in tumor cells, e.g. catalase and superoxide dismutase<sup>7</sup> (SOD) (Drisko et al., 2003; González et al., 2005; Li and Schellhorn, 2007); (2) increased glycolytic metabolism with subsequent increase of GLUTs, which supports the entry of DHA into tumor cells (González et al., 2005); and (3) lower sensitivity of the mitochondria of normal cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to tumor cells (Chen et al., 2007). Although the mechanism of cytotoxicity remains unsolved, it has been suggested that it depends on the production of extracellular hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), using ascorbate radical as an intermediate (Chen et al., 2007; Olney et al., 2013). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced diffuses across cell membranes causing cell death through different pathways, being the main proposed mechanism the ATP depletion (Du et al., 2010).

Based on the above mentioned evidences underlying the cytotoxic potential of AA related to an increase of oxidative stress (Du et al., 2012) and the already known close link between CRC and oxidative stress (Stone et al., 2014), we intend to explore *in vitro* the AA's mechanism of action on three CRC cell lines with a different genetic background and origin in the colon.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell culture

Three human cell lines of CRC, two from left colon, C2BBE1 [clone of Caco-2] (ATCC® CRL--2102<sup>TM</sup>) and WiDr (ATCC® CCL--218<sup>TM</sup>), and one from cecum LS1034 (ATCC® CRL--2158<sup>TM</sup>), acquired from American Type Culture Collection, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM (Sigma) and Roswell Park Memo-

<sup>6</sup> GLUT, glucose transporter.

<sup>7</sup> SOD, superoxide dismutase.

**Table 1**

IC<sub>50</sub> values obtained for C2BBE1, LS1034 and WiDr cells after exposure to AA. Cell proliferation was determined by SRB assay after 24, 48, 72 and 96 h.

Incubation Time (h)	C2BBE1		LS1034		WiDr	
	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>
24	0.95	0.91	4.85	0.98	2.29	0.98
48	0.95	0.99	4.33	0.99	1.59	0.94
72	0.65	0.92	9.11	0.98	2.55	0.98
96	0.82	0.96	5.37	0.96	5.90	0.93

The data express the results of, at least, three independent experiments per cell line in triplicate. Half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were obtained using the equation of the sigmoid fitted curves. R<sup>2</sup> is the coefficient of determination of the fitted curves.

rial Institute Medium, RPMI-1640 (Sigma), respectively. Cells were maintained at 37 °C with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Cells treatment

For the evaluation of cell proliferation after AA treatment, cells were incubated with increasing concentrations of AA (0.25–20 mM) for 24, 48, 72 and 96 h. All the subsequent experiments were performed 24 h after AA exposure. To determine whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radical were required for the cytotoxic effects after AA treatment, all cell cultures were treated with AA and catalase (600 U/mL) and with AA and mannitol (40 mM), respectively. The cell lines sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was also evaluated using increasing concentrations (10–750  $\mu$ M). The concentrations of AA used in other experiments were based on the IC<sub>50</sub><sup>8</sup> (half-maximal inhibitory concentration) values obtained for each cell line.

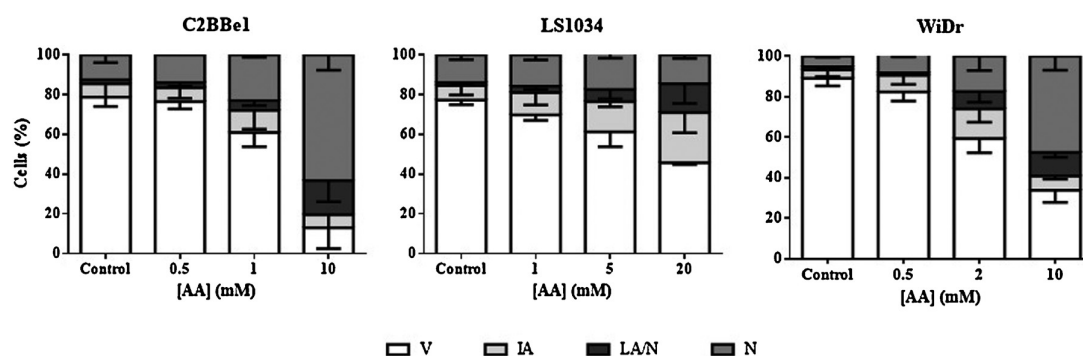
### 2.3. Assessment of AA cytotoxicity

To evaluate the effect of AA (Sigma) on cell proliferation it was used the colorimetric sulphorhodamine B (SRB) assay, a negatively charged pink aminoxanthine dye that gives a measure of protein synthesis (Houghton et al., 2007). Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and then fixed with a frozen solution of 1% acetic acid in methanol for 30 min at 4 °C and then incubated for 1 h with 0.4% SRB (Sigma), at room temperature and kept in the dark. After this period, multiwells were washed and a solution of 10 mM Tris.NaOH (pH = 10) was added. Absorbance was quantified at 540 nm with a reference filter of 690 nm in an ELISA spectrophotometer (Biotek® Synergy HT). Results obtained were analyzed and processed in the software OriginPro v.8.0, being cytotoxicity expressed as percentage of cell proliferation inhibition correlated with control experiments. The IC<sub>50</sub> values were determined through a sigmoid fitting.

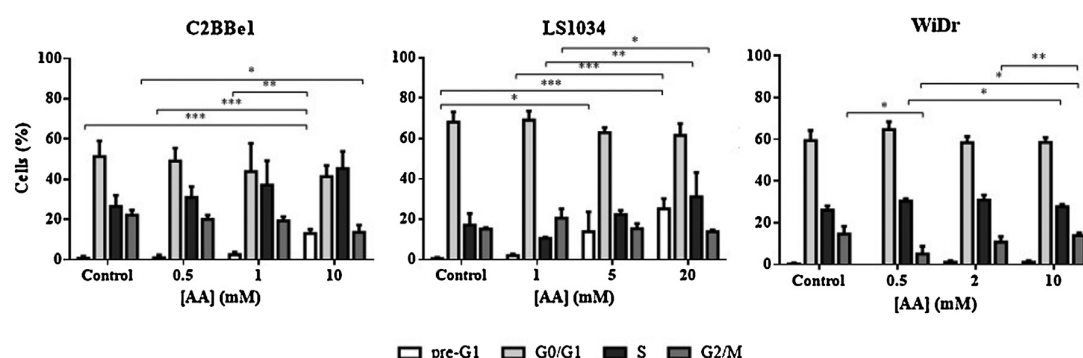
To evaluate cell survival based on the capacity of a single cell to grow and form a colony after AA exposure, the clonogenic assay was performed (Franken et al., 2006). For this study at least 500 cells were seeded per well and after 24 h were incubated with three different concentrations of AA (lower than IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> and upper than IC<sub>50</sub>). Colonies formation was assessed after twelve days, and the number of colonies was counted and the plate efficiency and survival factor determined, as described before (Mamede et al., 2012a,b).

In order to evaluate cell viability and death, annexin-V/propidium iodide (AV/PI) incorporation assay was used (Brito et al., 2012; Sgonc and Gruber, 1998). In this assay, 10<sup>6</sup> cells were incubated for 15 min in binding buffer with 2.5  $\mu$ L of AV (Immunostep) and 1  $\mu$ L of PI (Immunostep). The results were expressed as the percentage of viable, early apoptotic, late apoptotic/necrotic and

<sup>8</sup> IC<sub>50</sub>, half-maximal inhibitory concentration.



**Fig. 2.** Cell viability analysis of C2BBel (A), LS1034 (B) and WiDr (C) cells after exposure to AA. Cell viability and death was assessed by flow cytometry using dual-staining with AV/IP, after 24 h of incubation with the described AA concentrations. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of viable (V), in initial apoptosis (IA), in late apoptosis and/or necrosis (LA/N) and necrotic cells (N) of at least two independent experiments in duplicate.



**Fig. 3.** Changes on cell cycle of C2BBel (A), LS1034 (B) and WiDr (C) cells after exposure to AA. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry, using propidium iodide staining, after 24 h treatment. Data represent the mean  $\pm$  SD of cells in pre-G1, G0/G1, S and G2/M phases of at least three independent experiments per cell line. Statistically significant differences are shown with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

necrotic cells. The analysis was performed using a six parameter, 4-color FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 15 nW argon laser. At least  $10^4$  events were collected using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) and analyzed using Paint-a-Gate software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

#### 2.4. Analysis of cell cycle, mitochondrial membrane potential<sup>9</sup> ( $\psi_m$ ) and BAX and BCL-2 expression

Changes in cell cycle,  $\psi_m$  and BAX and BCL-2 expression were measured by flow cytometry with the equipment and software aforementioned.

Propidium iodide intercalates DNA allowing the quantification of DNA content (Mansilla et al., 2003). A  $10^6$  cell suspension was incubated with 200  $\mu$ L of 70% ethanol, during 30 min at 4 °C, protected from light. Cells were washed and incubated with 200  $\mu$ L of PI/RNase solution (Immunostep) for 15 min in dark. Results are expressed as the percentage of cells at each phase of cell cycle (G0/G1, S and G2/M phases) estimated from their histograms of DNA content. The apoptotic peak (pre-G1) was also quantified.

The 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolocarboxyanine iodide (JC-1, Sigma) dye is a lipophilic cationic molecule which enters mitochondria as a monomer (M) and forms red fluorescent aggregates (A) in polarized mitochondria. If  $\psi_m$  is low, JC-1 disperses to green-fluorescing monomers (Yao et al., 2008). A cell suspension of  $10^6$  cells was incubated with JC-1 (Sigma) dur-

ing 15 min at 37 °C, at a final concentration of 5 mg/mL. Posteriorly, cells were washed with PBS and analysed in a flow cytometer. An estimate of  $\psi_m$  is given by the ratio between the intensities of red and green fluorescence (A/M). The results are represented as aggregate/monomer fluorescence intensities ratio relative to control (Mamede et al., 2012a,b).

BAX and BCL-2 proteins are members of the pro-apoptotic and anti-apoptotic protein families, respectively. To maintain homeostasis it is crucial the control of the amount of active proteins of each family and its tissue expression (Petros et al., 2004). BAX and BCL-2 expression was evaluated according with Brito et al., (2012), using the following antibodies anti-Bax-PE (Santa Cruz Biotechnology, sc-20067 PE) and 3  $\mu$ L of anti-Bcl2-FITC (Santa Cruz Biotechnology, sc-509 FITC). The results were expressed as BAX/BCL-2 ratio of fluorescence intensities relative to control.

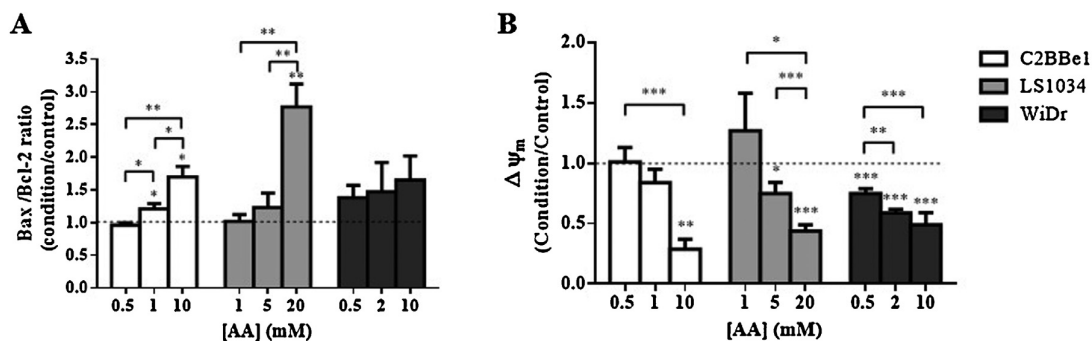
#### 2.5. Oxidative stress evaluation

Intracellular levels of reactive oxygen species<sup>10</sup> (ROS) and reduced glutathione<sup>11</sup> (GSH) expression were measured by flow cytometry. Dihydroethidium (DHE) easily crosses cell membranes and is converted by superoxide radical to ethidium, a red fluorescent compound which intercalates in DNA (Dikalov et al., 2007). In turn, in the presence of peroxides, 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH<sub>2</sub>) is oxidized originating dichlorofluorescein (DCF), a highly green fluorescent compound, which emitted fluorescence is pro-

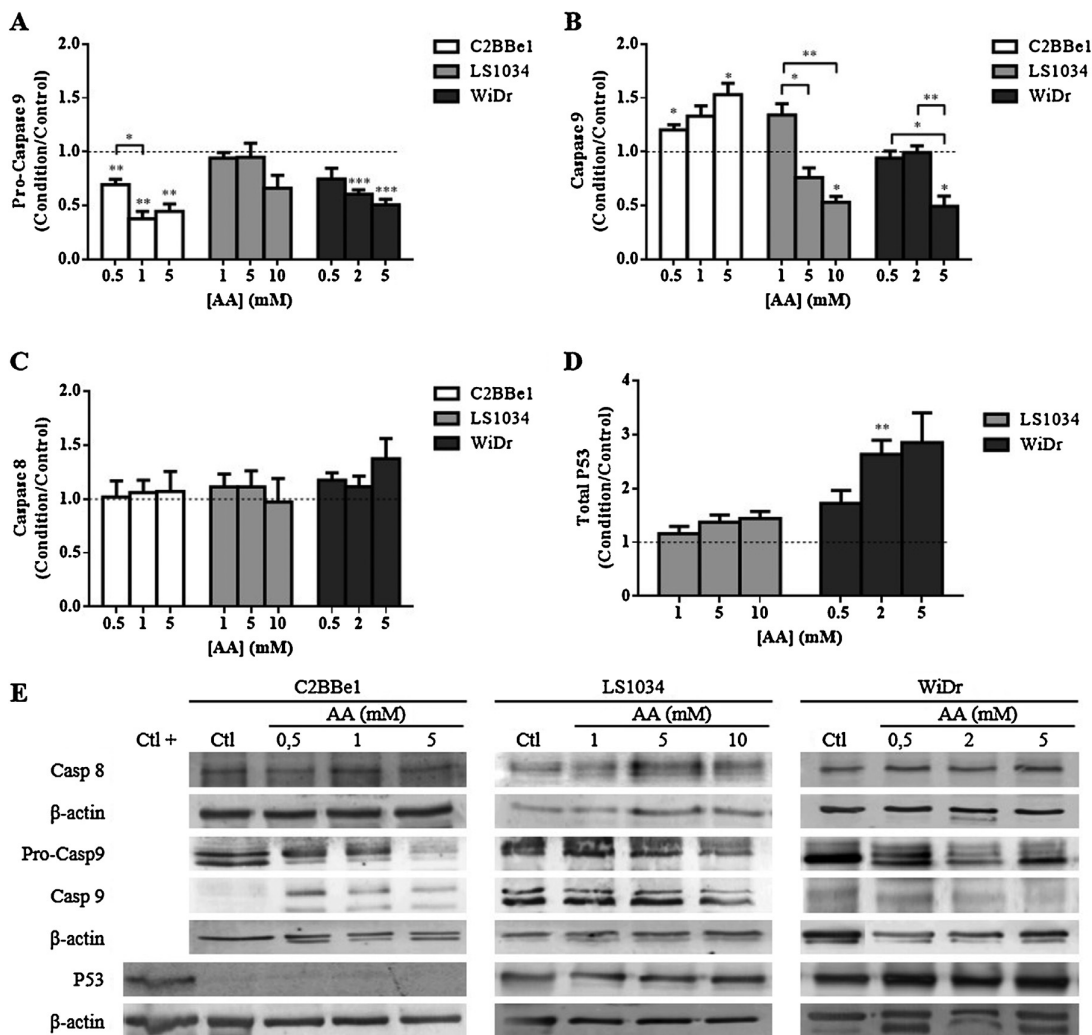
<sup>9</sup>  $\psi_m$ , mitochondrial membrane potential.

<sup>10</sup> ROS, reactive oxygen species.

<sup>11</sup> GSH, reduced glutathione.

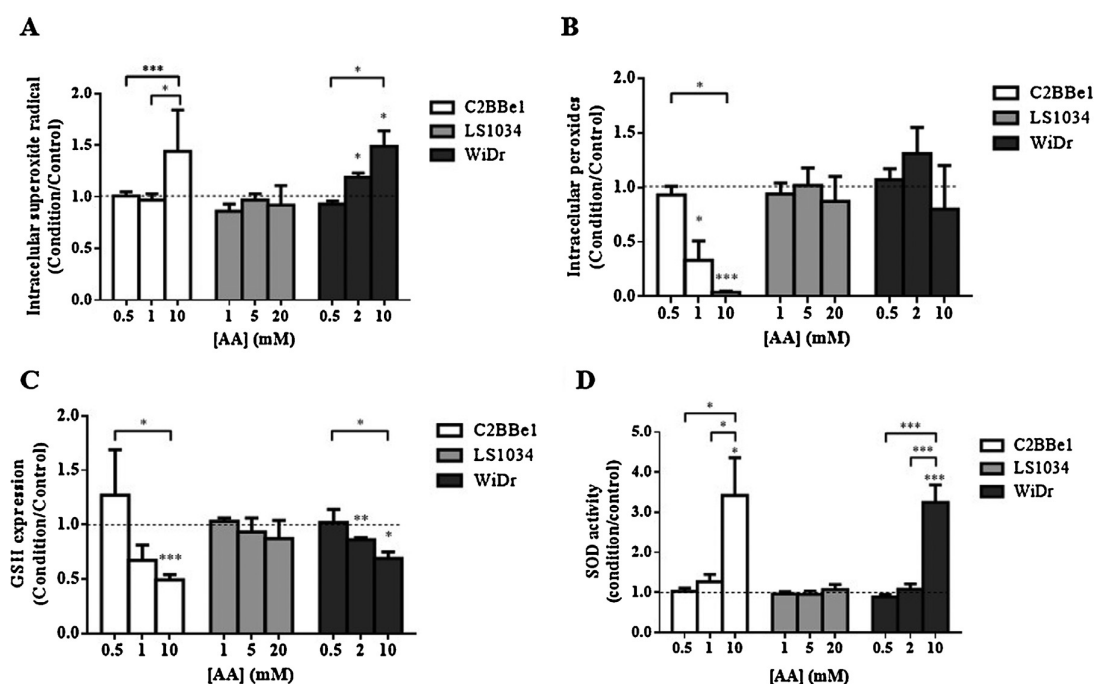


**Fig. 4.** Analysis of BAX and BCL-2 expression and mitochondrial membrane potential ( $\Psi_m$ ) after exposure of C2BBel1, LS1034 and WiDr cells to AA. (A) BAX/BCL-2 ratio and (B) mitochondrial membrane potential alterations ( $\Delta\Psi_m$ ) were assessed by flow cytometry 24 h after treatment. Results of apoptosis-related proteins and  $\Delta\Psi_m$  are respectively expressed as BAX/BCL-2 ratio and aggregates/monomers (A/M) for each condition and cell line and express the mean  $\pm$  SD of at least two independent experiments in duplicate. Statistically significant differences are shown with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

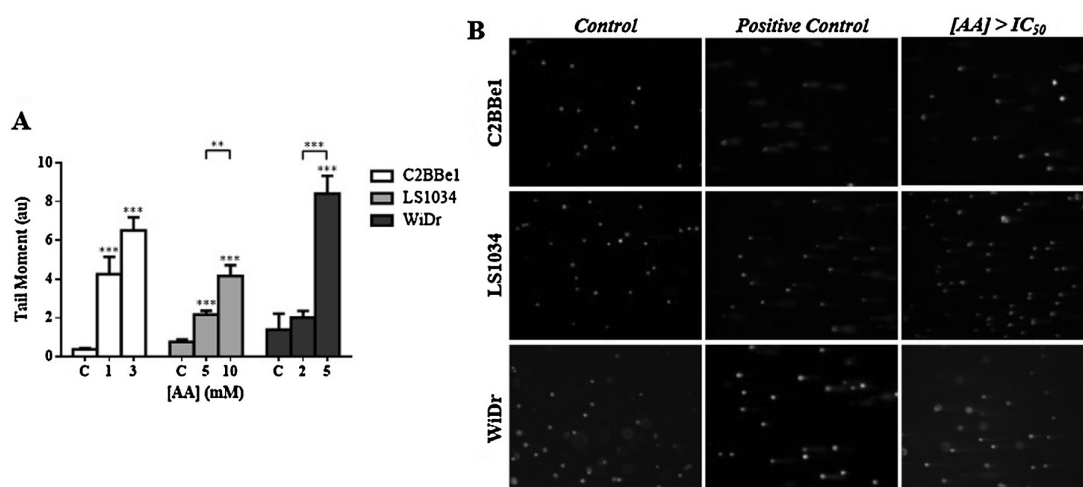


**Fig. 5.** Analysis of caspases-9 and -8 and P53 expression after exposure of C2BBel1, LS1034 and WiDr cells to AA. (A) Pro-caspase-9, (B) caspase-9, (C) caspase-8 and (D) P53 expressions were assessed by western blot 24 h after of treatment. Results are respectively expressed as protein expression/ $\beta$ -actin ratio and represent the mean  $\pm$  SE of at least three independent experiments in duplicate. Image (E) is a representative immunoblot of the results. Statistically significant differences are shown with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .





**Fig. 6.** Analysis of oxidative stress on C2BBel1, LS1034 and WiDr cells after exposure to AA. Intracellular levels of superoxide radical (A), peroxides (B) and GSH expression (C) were measured by flow cytometry using labelling with DHE, DCFH<sub>2</sub>-DA and mercury orange, respectively. SOD activity (D) was measured by a dedicated kit and it is represented as percentage of SOD activity per quantity of protein. The data represent the mean  $\pm$  SD or mean  $\pm$  SE relative to control of at least three independent experiments per cell line. Statistically significant differences are shown with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig. 7.** Analysis of DNA damage on C2BBel1, LS1034 and WiDr cells after exposure to AA. DNA strand breaks were measured by alkaline comet assay. (A) Tail moment expressed as the mean  $\pm$  SE of at least 100 randomly scored comets, per cell line and condition, from three independent experiments. (B) Comet assay images stained with ethidium bromide are shown in group non-treated (control), treated with 20 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (positive control) and treated with the highest AA concentrations for each cell line (AA).

portional to the concentration of intracellular peroxides (Myhre et al., 2003). On the other hand, mercury orange reacts with GSH and the reaction product emits an intense red fluorescence (Hedley and Chow, 1994). A 10<sup>6</sup> cell suspension was resuspended in PBS and incubated with 5  $\mu$ L of 1 mM DHE (Sigma) for 15 min or with 1  $\mu$ L of 5  $\mu$ M DCFH<sub>2</sub>-DA (Immunostep) for 45 min or with 4  $\mu$ L of 10 mM mercury orange (Sigma) for 15 min, at 37 °C and protected from light. Results are expressed as the mean of fluorescence intensity (MFI) normalized to control (Mamede et al., 2012a,b).

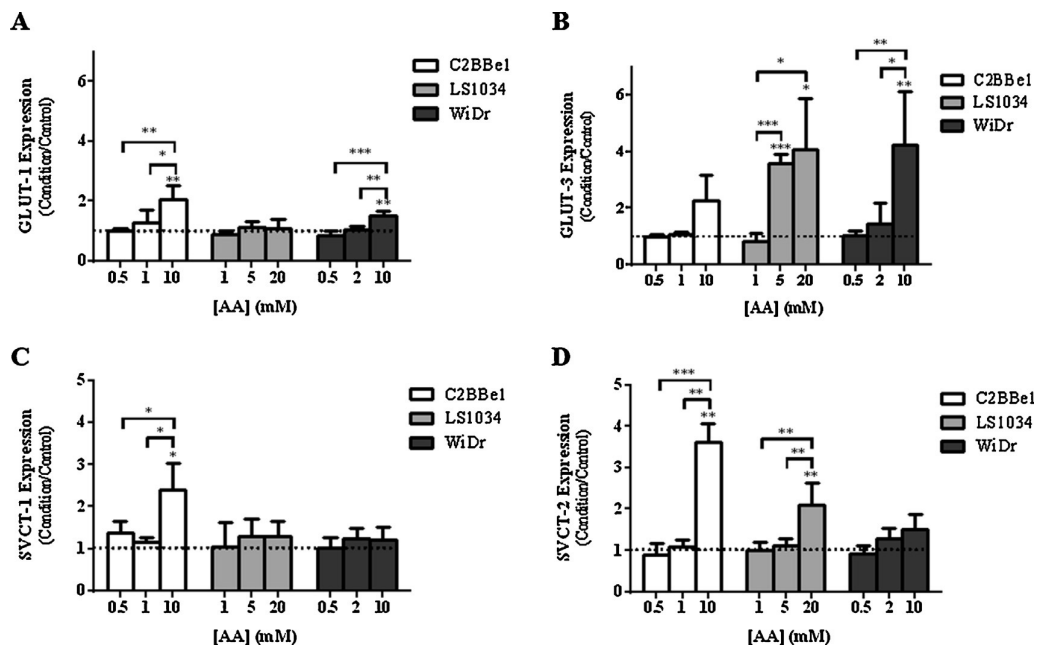
SOD activity of cell protein extracts submitted to different concentrations of AA was measured using the SOD assay kit (Sigma) and

following the supplier instructions. The results were expressed as the condition/control ratio, normalized to the protein concentration. The protein concentration was measured by the BCA<sup>TM</sup> protein assay (Pierce).

The effect of oxidative stress inhibitors and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell proliferation was evaluated using the before-cited SRB assay.

## 2.6. DNA damage quantification

Comet assay was used in order to assess DNA damage induced by different concentrations of AA as described before (Santos et al.,



**Fig. 8.** Analysis of vitamin C transporters after exposure of C2BBel, LS1034 and WiDr cells to AA. Membranar expression of GLUT-1 (A), GLUT-3 (B), SVCT-1 (C) and SVCT-2 (D) was assessed by flow cytometry. Data represent the mean  $\pm$  SE relative to control of at least three independent experiments per cell line. Statistically significant differences are shown with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

2014). As positive control exposure to 20 nM  $H_2O_2$  was used. Images were acquired using an inverted fluorescence microscope and treated with Motic Images v.2.0 (Microscope World) software. The analysis was performed using TriTek CometScore™ Freeware v.1.5 that allows calculation of the tail momentum (the product of tail length and percentage of DNA present in the comet tail). At least 100 randomly selected comets were analyzed.

## 2.7. Western blot analysis

Western blot was used to determine the effect of AA on P53, caspase-8 and caspase-9 expression. Protein extracts were prepared using an appropriate lysing buffer and the protein concentration was measured by the BCA™ protein assay (Pierce). Denatured protein samples were run on SDS-PAGE gel (P53: 20 min at 80 V, 1h25 at 160 V; caspase-8: 10 min at 100 V, 1h25 at 160 V; caspase-9: 10 min at 100 V and 1h30 at 150 V), followed by electrotransfer (1 h at 100 V) onto an immuno-blot PVDF membrane (Immobilon, IPVH00010). Standard protein markers (Nzytech, MB09002) were used. Membranes were incubated with primary antibodies anti-P53 (Santa Cruz Biotechnology, sc-47698), anti-caspase-8 (Immunotech), anti-caspase-9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8355), then with secondary antibody goat-anti-mouse (GE Healthcare), diluted 1:20000 in TBST solution with 4% BSA (Nzytech, MB15601), followed by ECF substrate (GE Healthcare). Membranes were revealed using a fluorescence reader (Typhoon FLA 9000).

## 2.8. Membrane expression of vitamin C transporters

Vitamin C can be transported inside cells by several mechanisms and in its two forms, the reduced form (AA) by SVCTs and the oxidized form (DHA) by GLUTs (Corti et al., 2010). Membrane expression of GLUT-1 and -3 and SVCT-1 and -2 were determined by flow cytometry as described before (Brito et al., 2015). For that, the following primary antibodies were used: anti-hGLUT1-PE (R&D Systems, FAB1418P), anti-hGLUT3 (R&D Systems, MAB1415),

anti-SVCT1 (Santa Cruz Technology, sc-376090) and anti-SVCT2 (Santa Cruz Technology, sc-30114). In the case of GLUT-3 and SVCT-labeling, secondary antibodies were also necessary, namely goat anti-mouse IgG-PE (Santa Cruz Biotechnology, sc-3738) and mouse anti-rabbit IgG-PE (Santa Cruz Biotechnology, sc-3753).

## 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS software v.20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). The assessment of normal distribution and variance of the quantitative variables was performed in accordance with the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. In the comet assay data analysis, normality was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test ( $n > 30$ ). In the case of normal underlying distributions and homogeneity of variance, parametric tests were used to make comparisons, otherwise non-parametric tests were used. For comparing therapeutic conditions with the control, the analysis was performed using parametric Student *t*-test. Comparison of quantitative variables in more than two groups was obtained using one-factor ANOVA test with post-hoc analysis using the Games-Howel test (with variances homogeneity) and otherwise the Bonferroni correction. It was considered a significance level of 5%. Dose-response curves were fitted to a 3-parameter sigmoid equation using OriginPro Lab, v.8.

## 3. Results

### 3.1. AA decreases cell proliferation, survival and viability

To evaluate whether AA can inhibit cell proliferation, SRB assay was performed. Colon cancer cells were treated with increasing AA concentrations for 24, 48, 72 and 96 h in order to determine the  $IC_{50}$  (half maximal inhibitory concentration).  $IC_{50}$  values obtained from dose-response curves for each cell line are shown in Table 1. AA induced a decrease on cell proliferation in a cell type and dose-dependent manner on the three cell lines studied. In contrast, no time-dependency was observed.

Generally, C2BBE1 was the most sensitive to AA, since the obtained IC<sub>50</sub> values were significantly lower comparing to LS1034 ( $p < 0.001$ ) and WiDr cells ( $p < 0.05$ ) for all incubation times. LS1034 was the most resistant cell line to AA for shorter exposure times, since the higher IC<sub>50</sub> values ( $p \leq 0.001$ ) were obtained. After 24 h of exposure to AA, the IC<sub>50</sub> was 0.95 mM for C2BBE1 cells, 4.85 mM for LS1034 cells and 2.29 mM for WiDr cells. The concentrations tested in subsequent assays were based on these values, being chosen one concentration lower, other equal and another higher than the IC<sub>50</sub> value for each cell line.

The long-term effect of AA on colon cancer cells was evaluated by clonogenic assay, allowing the analysis of cell survival twelve days after cells treatment with different AA concentrations. As shown in Fig. 1, cell survival dramatically decreased with AA increase. When cells were incubated with 5 mM of AA, cell survival decreased to  $11.66 \pm 3.94\%$  for C2BBE1,  $1.52 \pm 0.10\%$  for LS1034 and  $1.51 \pm 0.35\%$  for WiDr cells ( $p < 0.001$  for all cell lines comparing to control).

To analyze whether this reduction in cell proliferation and survival induced by AA was accompanied by an increase of cell death, the effect of AA on cell viability was determined by flow cytometry, using a double staining with AV and IP. According to the results shown in Fig. 2, increasing concentrations of AA induced a decrease on cell viability in all colon cancer cell lines studied. C2BBE1 cell line was the most sensitive to AA with a decrease of 65.8% on cell viability after incubation with 10 mM of AA ( $p < 0.001$ ), while LS1034 proved to be the most resistant one with a decrease of 31.5% on cell viability with twice of AA concentration ( $p < 0.001$ ) comparing to control. The reduction of C2BBE1 viable cells population was accompanied by an increase of 15.3% of cells in late apoptosis and necrosis and 50.8% of necrotic cells population with 10 mM of AA ( $p < 0.001$ ). In LS1034 cells, a predominance of apoptosis and late apoptosis/necrosis was observed with 20 mM of AA. In WiDr cells an increase of 10.5% of apoptotic cells is seen with 2 mM of AA, however, higher concentrations of AA (10 mM) induce cell death predominantly by necrosis ( $p = 0.004$ ).

### 3.2. AA causes alterations on cell cycle and apoptosis-related proteins expression depending on CRC cell line

As shown in Fig. 3, cell cycle analysis indicate that higher AA concentrations induce cell cycle arrest of C2BBE1 and LS1034 cells on S phase, with an increase of 18.8% and 14.0% ( $p = 0.007$ ) of cells compared to control, respectively. This cell cycle blockade was accompanied with a decrease of cells in G2/M phase, statistically significant for C2BBE1 cells ( $p = 0.036$ ). Moreover, in accordance with the presence of C2BBE1 cells in late apoptosis and LS1034 cells in apoptosis after exposure to higher AA concentrations, a pre-G1 apoptotic peak was observed in both cell lines ( $p < 0.001$ ). The induction of cell death by apoptosis in C2BBE1 and LS1034 cells was also corroborated by the results of BAX and BCL-2 expression [Fig. 4A]. With increasing concentrations of AA, BAX/BCL-2 ratio rose for both cell lines. When C2BBE1 and LS1034 cells were exposed to higher AA concentrations, it is noticed that this ratio was 1.70 ( $p = 0.01$ ) and 2.77-fold ( $p = 0.006$ ) higher comparing to control.

Regarding WiDr cells, no relevant changes were observed on cell cycle and BAX/BCL-2 ratio depending on the increase of AA concentration.

### 3.3. AA induces mitochondrial dysfunction

Regarding  $\Psi_m$  alterations [Fig. 4B], it can be seen that as AA concentrations increase, mitochondrial dysfunction increases in all cell lines. With higher AA concentrations,  $\Delta\Psi_m$  was reduced 3.3

**Table 2**

IC<sub>50</sub> values obtained for C2BBE1, LS1034 and WiDr cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AA, AA + catalase, AA + mannitol. Cell proliferation was determined by SRB assay 24 h after treatment.

Incubation Time (h)	C2BBE1		LS1034		WiDr	
	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)	r <sup>2</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.26	0.99	0.30	0.99	0.27	0.98
AA	1.06	0.96	4.94	0.90	2.4	0.98
AA + Catalase	>10	–	>20	–	>10	–
AA + Mannitol	0.87	0.99	17.54	0.80	>20	–

The data express the results of, at least, three independent experiments in triplicate per cell line. Half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were obtained using the equation of the sigmoid fitted curves. R<sup>2</sup> is the coefficient of determination of the fitted curves.

times for C2BBE1 ( $p = 0.001$ ), 2.3 times for LS1034 ( $p < 0.001$ ) and 2 times for WiDr ( $p < 0.001$ ) cells, comparing to control.

Thereby, an induced cell death by mitochondria-dependent pathway in C2BBE1 cells was also supported by the results obtained for caspases expression, as can be seen in Fig. 5A–C and E. In this case, caspase-9 activation was observed, since as AA concentration increased, there was a decrease in pro-caspase-9 ( $0.44 \pm 0.07$  for 5 mM,  $p < 0.01$ ) accompanied by an increase in caspase-9 ( $1.53 \pm 0.11$  for 5 mM,  $p < 0.05$ ). For LS1034 and WiDr cells, the highest AA tested concentration halved pro-caspase-9 and caspase-9 expressions, comparing to control ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively). No statistical differences were observed in caspase-8 expression [Fig. 5C and E].

### 3.4. AA induces an increase on P53 expression in WiDr cells

The effect of different concentrations of AA on P53 expression was analyzed. Immunoblotting of cell lysates revealed the absence of P53 expression in C2BBE1 as shown in Fig. 5E. It is perceptible in Fig. 5D an increment of P53 expression in WiDr cells as AA concentration increases. When cells were treated with 2 and 5 mM of AA, P53 expression was respectively 2.63 ( $p = 0.003$ ) and 2.85-fold higher comparing to control. No statistical differences were observed in LS1034 cells.

### 3.5. AA induces alterations in oxidative stress of C2BBE1 and WiDr but not LS1034 cells

AA is described to be toxic for cancer cells due to its involvement in the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Olney et al., 2013). To determine changes caused by AA in the redox state of the three colon cancer cell lines, intracellular superoxide radical and peroxides levels, as well as, GSH expression and SOD activity were measured, whose results are shown in Fig. 6.

It is noticed that there was a statistically significant 1.44- and 1.49-fold increment of superoxide radical levels [Fig. 6A], when C2BBE1 and WiDr cells were treated with 10 mM of AA ( $p < 0.05$ ). Relatively to peroxides production [Fig. 6B], there was an AA dose-dependent decrease for C2BBE1 cells. With 10 mM of AA, intracellular peroxides decreased 25 times ( $p < 0.001$ ).

When antioxidant defenses of C2BBE1 and WiDr cells are analyzed, it is observed a decrease in GSH expression dependent on AA concentration [Fig. 6C], being  $0.49 \pm 0.05$  for C2BBE1 ( $p < 0.001$ ) and  $0.69 \pm 0.06$  for WiDr cells ( $p = 0.012$ ) after exposure to 10 mM of AA. The activity of the antioxidant enzyme SOD was incremented [Fig. 6D], since higher AA concentrations induced a statistically significant increase of 3.42-fold for C2BBE1 ( $p < 0.05$ ) and 3.24-fold for WiDr cells ( $p < 0.001$ ).

Regarding LS1034 cells, there were no significant changes on intracellular superoxide radical and peroxides levels and on the expression of GSH and SOD activity. This fact let us think if AA

cytotoxic effect on LS1034 cells is not mediated by oxidative stress or if LS1034 cells are not sensitive to  $H_2O_2$ . In order to clarify whether cell lines under study were sensitive to  $H_2O_2$ , cells were incubated with increasing concentrations of  $H_2O_2$  during 24 h in order to determine  $IC_{50}$  using SRB assay.  $IC_{50}$  values obtained from dose-response curves for each cell line are shown in Table 2. For  $H_2O_2$  concentrations above 250  $\mu M$ , cell proliferation clearly dropped in a dose-dependent manner, being the  $IC_{50}$  values obtained quite similar between cell lines (260  $\mu M$ , 300  $\mu M$  and 270  $\mu M$  for C2BBE1, LS1034 and WiDr, respectively).

Using oxidative stress inhibitors, it was also possible to determine whether  $H_2O_2$  and hydroxyl radical interfered with AA effects. The  $IC_{50}$  values obtained are compared in Table 2. When cells were incubated with AA and catalase (a  $H_2O_2$  inhibitor), the cytotoxic effect of AA was significantly reverted, insofar as it was not even possible to determine the  $IC_{50}$  values (>10 mM) of the three cell lines. This fact hints that  $H_2O_2$  is implicated on AA cytotoxic effect. On the other hand, when cells were exposed to AA and mannitol (an hydroxyl radical inhibitor), no statistical differences were observed for C2BBE1 and LS1034. Notwithstanding the  $IC_{50}$  value obtained for WiDr cells (>20 mM) significantly increased compared with AA exposure alone (2.4 mM,  $p=0.029$ ), revealing the involvement of hydroxyl radical on AA cytotoxic mechanism.

### 3.6. AA mediates DNA damage in the three CRC cell lines

To evaluate genotoxicity of AA in colon cancer cells, the alkaline comet assay was used allowing assessing DNA strand breaks. Quantitative results are shown in Fig. 7A and represent the tail moment, a measure of the amount of DNA in tail along with its distribution in tail. Qualitative results are shown in Fig. 7B). In all cell lines, AA caused DNA damage in a dose-dependent manner, being statistically significant for higher concentrations of AA ( $p < 0.001$ ), relatively to control or to lower concentrations. When cells are treated with higher concentrations of AA, tail moment increased  $6.52 \pm 0.68$  times for C2BBE1,  $4.17 \pm 0.55$  times for LS1034 and  $8.42 \pm 0.93$  times for WiDr cells.

### 3.7. AA alters vitamin C transporters expression depending on cell line

The influence of AA on GLUTs and SVCTs expression can be related with its cytotoxic mechanism. Therefore, they were analysed by flow cytometry. Fig. 8 shows results normalized to control and indicates that AA influences the expression of vitamin C transporters in a dose-dependent manner. In C2BBE1 cells, with 10 mM of AA, expression of GLUT-1 ( $p=0.006$ ), SVCT-1 ( $p=0.013$ ) and SVCT-2 ( $p=0.005$ ) increased at least twice of the respective control. In LS1034 cells, GLUT-3 and SVCT-2 were 4.06 ( $p=0.033$ ) and 2.09-fold ( $p=0.003$ ) higher than control, respectively. In WiDr cells, AA just influenced GLUTs expression, inducing an increase of GLUT-1 ( $1.49 \pm 0.17$ ;  $p=0.009$ ) and GLUT-3 ( $4.23 \pm 1.88$ ;  $p=0.008$ ) when present in the higher tested concentration.

## 4. Discussion

The maintenance of the high incidence of CRC has forced the development of new and more effective tools to treat this cancer (DeSantis et al., 2014).

Several studies have shown that AA plays a selective cytotoxic effect on tumor cells, but not in normal ones (Chen et al., 2005; Herst et al., 2012; Hong et al., 2007; Ranzato et al., 2011; Vuyyuri et al., 2013). The increased production of hydrogen peroxide, coupled with the breakdown of the activity of antioxidant enzymes and the presence of transition metals in cancer cells, may result in

its selective cytotoxicity and the subsequent revelation of its therapeutic potential (Mamede et al., 2012a,b). In this way, the use of high doses of AA for the treatment of different types of cancer has long been reported, however, its mechanism of action is not yet fully understood (Du et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Ma et al., 2014). The mechanism of AA transport inside the cell can also be implicated in its cytotoxic action.

In order to evaluate how three different colorectal cancer cell lines of different anatomical origin (Abrantes et al., 2014) and with different genetic profiles respond to AA treatment, several experiments were performed which have yielded new knowledge about its applicability as a therapeutic tool.

Previous findings showed that pharmacologic AA concentrations induced a cytotoxic effect in many types of cancer cells *in vitro* (Chen et al., 2008; Mamede et al., 2012a,b). Our results also suggest that AA has a cytotoxic effect in the three CRC cell lines under study. This cytotoxic and anti-proliferative effect depends on the cell line and AA concentration, but not on the incubation time. The  $IC_{50}$  values obtained indicated that C2BBE1 cells were the most sensitive to AA, while LS1034 cell line was the most resistant one. The results gathered with the double staining with annexin-V and propidium iodide also corroborated the cytotoxic effect of AA and the highest sensibility of C2BBE1 cells to it. Upregulation of vitamin C transporters promoted by the treatment with AA in this cell line indicates that AA could enter inside C2BBE1 cells by SVCTs, but it can also be converted in its oxidized form (DHA) and enters through GLUTs. Inside the cell, DHA is rapidly converted into AA (McCarty, 2013). On the other hand, Chen et al. showed that AA could act as a pro-drug to deliver  $H_2O_2$  to cells, which will be a mediator of cell death (Chen et al., 2005). Thus, damage caused by the presence of AA in the extracellular medium, together with the increasing presence of AA and DHA in the intracellular environment, due to overexpression of SVCTs and GLUTs, allowed a considerable increase of oxidative stress in C2BBE1 cells, making them more sensitive to AA.

A long-term effect of AA was observed in all cell lines under study, insofar as AA concentration increases, survival factor decreases. This means that continued exposure to AA weakened any defense mechanisms of resistant cells. Regarding cell death, our results showed that the type of induced cell death depends on the cell line. AA induced cell death predominantly by apoptosis and necrosis in C2BBE1 cells, by apoptosis in LS1034 cells and by necrosis in WiDr cells.

BCL-2 family proteins is a family of apoptosis repressor proteins (like BCL-2) and inducer proteins (like BAX) that can actively participate in the regulation of apoptosis (Yip and Reed, 2008). AA decreased cell viability of all cell lines under study, however, in C2BBE1 and LS1034 cells, it seems that AA induced apoptosis through the mitochondria-dependent pathway, since we observed a decrease on  $\Psi_m$  and BAX/BCL-2 expression. In C2BBE1 cells, it was also corroborated by caspase-9 activation. Valko et al. described a relation between necrosis and a more intense oxidative stimulus than the necessary to conduct cells to apoptosis (Valko et al., 2006), fact that possibly explains the presence of necrosis in C2BBE1 and WiDr cells. Golstein and Kroemer also described that caspase inhibition can sensitize cells to the induction of necrosis (Golstein and Kroemer, 2007), which is in agreement with the decrease of pro-caspase-9 and caspase-9 expression obtained for WiDr cells after exposure to AA.

There remains the doubt about how AA really exerts its cytotoxic effects. With this work we concluded that AA mechanisms of action depend on the cell line under study. Meyong-Sok Lee and collaborators hypothesized that an increment of oxidative stress via a differentially regulated P53 transcriptional network could enhance AA cytotoxicity (Kim et al., 2012). In our study, C2BBE1 cells (P53-null) proved that AA can induce cell death by a P53-independent pathway. On the other hand, the increment of P53

expression caused by AA in WiDr cells could suggest an antitumor activity via P53 in this cell line, related with the induction of necrosis. Recently, evidences showed another facet of P53 as a modulator of necrosis, being required for necrotic cell death activation (Nikoletopoulou et al., 2013).

Knowing in advance that AA antitumor effects mainly reside on the induction of oxidative stress (Duarte et al., 2007; Gonçalves et al., 2013), with this study we concluded that AA induces alterations on cells oxidative stress, nevertheless, this effect is not similar to all cell lines studied. The studies performed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its inhibitor (catalase) became clear that the three cell lines are sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In C2BBE1 and WiDr cells, with higher AA concentrations, intracellular concentration of superoxide radical increased, while antioxidant defense GSH decreased, as an indicative of oxidative stress increment (Manda et al., 2009). For higher AA concentrations, an increase of SOD activity was observed, suggesting a consequent generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chen et al. (2007) proposed a mechanism, according to which AA is oxidized forming Asc<sup>•-</sup> with the release of an electron. The donation of this electron to oxygen by the reduced metal ion leads to the formation of radical superoxide, which is in turn converted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen et al., 2007). In WiDr cells, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation may happen in extracellular medium (Duarte et al., 2007), but also at intracellular level, since vitamin C can enter these cells in its oxidized form (DHA) by GLUT-1 or -3, that were increased in the presence of 10 mM of AA. Many authors described that once inside a cell, DHA is rapidly converted into AA (McCarty, 2013; Verrax et al., 2008), which may then mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. Thereafter, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed can damage cells or be converted in more reactive species by Fenton reaction, such as hydroxyl radical (Manda et al., 2009). Treatment of WiDr cells with AA and mannitol (hydroxyl radical inhibitor) suggests that AA cytotoxicity is mediated by hydroxyl radical, after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conversion.

However, a different AA cytotoxic mechanism may be involved in C2BBE1 cells, since the IC<sub>50</sub> obtained with combined treatment with AA and mannitol (0.87 mM) was very similar to the one obtained with AA alone (1.06 mM). Data suggest that AA may entered in the cell by SVCTs and possibly be oxidized into DHA, releasing electrons necessary for superoxide radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. However, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed is detoxified by GSH, justifying GSH consumption. Superoxide radical could thereby play an important role in AA-mediated cytotoxicity in C2BBE1 cells, reacting with nitric oxide (a reactive nitrogen specie not measured) and forming peroxynitrite radical (ONOO<sup>•</sup>). This one is a very powerful oxidant capable of trigger cellular responses as membranes damage, DNA fragmentation, lipid peroxidation, cytochrome c release and, consequently, apoptosis and necrosis (Hrabarova et al., 2011; Orrenius et al., 2007; Turrens, 2003). Most of these cellular events were observed in C2BBE1 cells after AA exposure, emphasizing this hypothesis.

To analyze whether AA induced DNA damage of cells, comet assay was performed. The tail moment is a measure of both the amount of DNA in tail, as well as, its distribution in the tail (Olive and Banáth, 2006). The results showed an increase of DNA damage with increasing concentrations of AA, suggesting that AA induces DNA damage in the three CRC cells. This fact was also quoted by different authors, revealing the AA ability in modulate the ROS mediated-DNA damage (Herst et al., 2012; Kontek et al., 2013; Ma et al., 2014).

LS1034 cells revealed to be the most resistant to AA. Interestingly, AA did not affect the redox environment of LS1034 cells, although the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibition induced a reversion on the AA cytotoxic effect. Barrera (Barrera, 2012) and Landriscina et al. (Landriscina et al., 2009) described that some types of cells are not directly affected by the increase of oxidative stress, because of their ability to adapt to redox changes. Thus, LS1034 may have acquired this adaptive response that allows them to survive under high oxidative stress and, moreover, provides them with

a form of resistance to chemotherapy and radiotherapy (Barrera, 2012; Casalta-Lopes et al., 2011). However, AA induced an anti-proliferative and cytotoxic effect and DNA damage in LS1034 cell line, which make us think that the inherent AA mechanism is not mediated by ROS. Some authors have already proposed an intracellular AA mechanism of action, relying on its effect over hypoxia inducible factor<sup>12</sup> (HIF-1 $\alpha$ ) activation (McCarty, 2013; Vissers et al., 2007; Wilson et al., 2014). The marked increase in GLUT-3 and SVCT-2 expression with increasing AA concentrations and an increase in <sup>99m</sup>Tc-AA uptake (Mamede et al., 2012a,b) over time (data not shown) proved that AA can be directly transported by SVCT-2 into LS1034 cells, but also indirectly in its oxidized form (DHA) through GLUT-3. Once inside the cell, AA is required as a cofactor for prolyl and asparryl hydroxylases optimal activity, enzymes responsible for HIF-1 $\alpha$  catabolism and transactivational activity (McCarty, 2013; Wilson et al., 2014). Given that HIF-1 $\alpha$  overexpression is related to angiogenesis, tumor progression and resistance to apoptosis (McCarty, 2013) and that LS1034 cells are sensitive to hypoxic insults (becoming more glycolytic) (Abrantes et al., 2014), pharmacological AA concentrations may downregulate HIF-1 $\alpha$  pathway and, consequently, protect LS1034 cells against more aggressive tumor behavior.

In conclusion, we show that pharmacological concentrations of AA induce anti-proliferative, cytotoxic and genotoxic effects on three colon cancer cell lines under study, one of them known as chemoresistant. We also found that AA-induced cell death and AA mechanism of action are not similar to all cell lines. C2BBE1 proved to be the most sensitive to AA and LS1034 the most resistant. Moreover, AA can induce cell death by an increment of oxidative stress, but also mediating a ROS-independent mechanism, as observed in LS1034 cells. This work explores AA anti-tumoral effects and highlights its applicability in the treatment of CRC, underlying the importance of proceeding to clinical trials.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Foundation for Science and Technology (FCT) for financial support to IBILI-FMUC through PEst-C/SAU/UI3282/2013 and to CNC. IBILI through strategic project UID/NEU/04539/2013. This work was also supported by PhD grants from FCT, to whom Ana Salomé Pires (SFRH/BD/75300/2010) and Ana Catarina Mamede (SFRH/BD/73649/2010) are grateful and by a scholarship from CIMAGO to whom João Carlos Encarnação (Project 09/12) is also grateful.

#### References

- Abrantes, A.M., Tavares, L.C., Pires, A.S., Casalta-Lopes, J.E., Mendes, C., Simões, M., Grazina, M.M., Carvalho, R.A., Botelho, M.F., 2014. Metabolic effects of hypoxia in colorectal cancer by <sup>13</sup>C NMR isotopomer analysis. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–10, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/759791>.
- Azzolini, C., Fiorani, M., Cerioni, L., Guidarelli, A., Cantoni, O., 2013. Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. *IUBMB Life* 65, 149–153, <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1124>.
- Barrera, G., 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012, 137289, <http://dx.doi.org/10.5402/2012/137289>.
- Brito, A., Abrantes, A., Pinto-Costa, C., Gomes, A., Mamede, A., Casalta-Lopes, J., Gonçalves, A., Sarmiento-Ribeiro, A., Tralhão, J., Botelho, M., 2012. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy* 58, 381–386, <http://dx.doi.org/10.1159/000343656>.
- Brito, A., Abrantes, A., Ribeiro, M., Oliveira, R., Casalta-Lopes, J., Gonçalves, A., Botelho, M., 2015. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose uptake in hepatocellular carcinoma: correlation with glucose transporters and p53 expression. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5 (3), 183–189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2015.05.003>.
- Casalta-Lopes, J., Abrantes, A., Laranjo, M., Rio, J., Gonçalves, A., Oliveiros, B., Sarmiento-Ribeiro, A., Botelho, M., 2011. Efflux pumps modulation in colorectal

<sup>12</sup> HIF, hypoxia inducible factor.

- adenocarcinoma cell lines: the role of nuclear medicine. *J. Cancer Ther.* 02, 408–417, <http://dx.doi.org/10.4236/jct.2011.23056>.
- Chen, Q., Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G.R., Shacter, E., Levine, M., 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Cell* 102, 13604–13609.
- Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Lee, J.-H., Krishna, M.C., Shacter, E., Choyke, P.L., Pooput, C., Kirk, K.L., Buettner, G.R., Levine, M., 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8749–8754, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702854104>.
- Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Pooput, C., Kirk, K.L., Krishna, M.C., Khosh, D.B., Drisko, J., Levine, M., 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11105–11109, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804226105>.
- Corti, A., Casini, A.F., Pompella, A., 2010. Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 500, 107–115, <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.014>.
- Daniel, G., 2011. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67, 1157–1166, <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1418-6>.
- DeSantis, C.E., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Siegel, R.L., Stein, K.D., Kramer, J.L., Alteri, R., Robbins, A.S., Jemal, A., 2014. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* 64, 252–271, <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21235>.
- Dikalov, S., Griendling, K.K., Harrison, D.G., 2007. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49, 717–727.
- Drisko, J.A., Chapman, J., Hunter, V.J., 2003. The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* 22, 118–123.
- Du, J., Martin, S.M., Levine, M., Taghiyev, A.F., Du, C., Knudson, C.M., Cullen, J.J., 2010. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 509–520, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1713>.
- Du, J., Cullen, J.J., Buettner, G.R., 2012. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 443–457, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>.
- Duarte, T.L., Almeida, G.M., Jones, G.D., 2007. Investigation of the role of extracellular H2O2 and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxicol. Lett.* 170, 57–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.02.005>.
- Franken, N., a, P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 1, 2315–2319, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>.
- Gonçalves, A.C., Alves, V., Silva, T., Carvalho, C., Oliveira, C.R., Sarmiento-Ribeiro, de, 2013. Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicol. Vitro* 27, 1542–1549, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.03.009>.
- González, M.J., Miranda-Massari, J.R., Mora, E.M., Guzmán, A., Riordan, N.H., Riordan, H.D., Casciari, J.J., Jackson, J.A., Román-Franco, A., 2005. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integr. Cancer Ther.* 4, 32–44, <http://dx.doi.org/10.1177/1534735404273861>.
- Hedley, D.W., Chow, S., 1994. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* 15, 349–358, <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.990150411>.
- Herst, P.M., Broadley, K.W.R., Harper, J.L., McConnell, M.J., 2012. Pharmacological concentrations of ascorbate radiosensitize glioblastoma multiforme primary cells by increasing oxidative DNA damage and inhibiting G2/M arrest. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1486–1493, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.021>.
- Hong, S.-W., Jin, D.-H., Hahn, E.-S., Yim, S.-H., Lim, J.-S., Kim, K.-I., Yang, Y., Lee, S.-S., Kang, J.-S., Lee, W.-J., Lee, W.-K., Lee, M.-S., 2007. Ascorbate (vitamin C) induces cell death through the apoptosis-inducing factor in human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 18, 811–815.
- Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Stenvont, G., Hylands, P.J., Lee, C.C., 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 42, 377–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.003>.
- Hrabarova, E., Juranek, I., Soltes, L., 2011. Pro-oxidative effect of peroxyxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation. *Gen. Physiol. Biophys.* 30, 223–238, <http://dx.doi.org/10.4149/gpb>.
- Kim, J., Lee, S.-D., Chang, B., Jin, D.-H., Jung, S.-I., Park, M.-Y., Han, Y., Yang, Y., Il Kim, K., Lim, J.-S., Kang, Y.-S., Lee, M.-S., 2012. Enhanced antitumor activity of vitamin C via p53 in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1607–1615, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.079>.
- Kontek, R., Kontek, B., Grzegorzczak, K., 2013. Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. *Arch. Med. Sci.* 9, 1006–1012, <http://dx.doi.org/10.5114/aoms.2013.39791>.
- Landriscina, M., Maddalena, F., Laudiero, G., Esposito, F., 2009. Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2701–2716, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2692>.
- Li, Y., Schellhorn, H.E., 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.* 137, 2171–2184.
- Lorenzoni, L., La Torre, M., Ziparo, V., Montebelli, F., Mercantini, P., Balducci, G., Ferri, M., 2014. Evidence based medicine and surgical approaches for colon cancer: evidences, benefits and limitations of the laparoscopic vs open resection. *World J. Gastroenterol.* 20, 3680–3692, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i13.3680>.
- Ma, Y., Chapman, J., Levine, M., Polireddy, K., Drisko, J., Chen, Q., 2014. High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Sci. Transl. Med.* 6, <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3007154>.
- Mamede, A.C., Tavares, S.D., Abrantes, A.M., Trindade, J., Maia, J.M., Botelho, M.F., 2011. The role of vitamins in cancer: a review. *Nutr. Cancer* 63, 479–494, <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2011.539315>.
- Mamede, A.C., Abrantes, A.M., Pires, A.S., Tavares, S.D., Serra, M.E., Maia, J.M., Botelho, M.F., 2012a. Radiolabelling of ascorbic acid: a new clue to clarify its action as an anticancer agent? *Curr. Radiopharm.* 5, 106–112, <http://dx.doi.org/10.2174/1874471011205020106>.
- Mamede, A.C., Pires, A.S., Abrantes, A.M., Tavares, S.D., Gonçalves, A.C., Casalta-Lopes, J.E., Sarmiento-Ribeiro, A.B., Maia, J.M., Botelho, M.F., 2012b. Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr): in vitro and in vivo studies. *Nutr. Cancer* 1–9, <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.713539>.
- Manda, G., Nechifor, M.T., Neagu, T.-M., 2009. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr. Chem. Biol.* 3, 342–366, <http://dx.doi.org/10.2174/17231309787158271>.
- Mansilla, S., Piña, B., Portugal, J., 2003. Daunorubicin-induced variations in gene transcription: commitment to proliferation arrest, senescence and apoptosis. *Biochem. J.* 372, 703–711, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021950>.
- McCarty, M.F., 2013. Expression and/or activity of the SVCT2 ascorbate transporter may be decreased in many aggressive cancers, suggesting potential utility for sodium bicarbonate and dehydroascorbic acid in cancer therapy. *Med. Hypotheses* 81, 664–670, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2013.07.023>.
- Mikirova, N., Casciari, J., Hunninghake, R., Riordan, N., 2013a. Intravenous ascorbic acid protocol for cancer patients: scientific rationale pharmacology, and clinical experience. *Funct. Foods Heal. Dis.* 3, 344–366.
- Mikirova, N., Casciari, J., Riordan, N., Hunninghake, R., 2013b. Clinical experience with intravenous administration of ascorbic acid: achievable levels in blood for different states of inflammation and disease in cancer patients. *J. Transl. Med.* 11, 191, <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-191>.
- Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., Fonnum, F., 2003. Evaluation of the probes 2,7-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1575–1582, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00083-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00083-2).
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3448–3459, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>.
- Ohno, S., Ohno, Y., Suzuki, N., Soma, G., I, M., 2009. High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res.* 29, 809–815.
- Oliver, P.L., Bánth, J.P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23–29, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.
- Olney, K.E., Du, J., van't Erve, T.J., Witmer, J.R., Sibenaller, Z.A., Wagner, B.A., Buettner, G.R., Cullen, J.J., 2013. Inhibitors of hydroperoxide metabolism enhance ascorbate-induced cytotoxicity. *Free Radic. Res.* 47, 154–163, <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2012.755263>.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovskiy, B., 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 143–183, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122>.
- Padayatty, S.J., Riordan, H.D., Hewitt, S.M., Katz, A., Hoffer, L.J., Levine, M., 2006. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ* 174, 937–942, <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.050346>.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W., 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83–94, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>.
- Ranzato, E., Biffo, S., Burlando, B., 2011. Selective ascorbate toxicity in malignant mesothelioma: a redox Trojan mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 108–117, <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2009-0340OC>.
- Santos, K., Laranjo, M., Abrantes, A.M., Brito, A.F., Gonçalves, C., Sarmiento Ribeiro, A.B., Botelho, M.F., Soares, M.L.L., Oliveira, A.S.R., Pinho e Melo, T.M.V.D., 2014. Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 79, 273–281, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.008>.
- Sgonc, R., Gruber, J., 1998. Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.* 33, 525–533.
- Stone, W.L., Krishnan, K., Campbell, S.E., Palau, V.E., 2014. The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* 6, 55–66, <http://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v6.i3.55>.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
- Verrax, J., Taper, H., Buc Calderon, P., 2008. Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy. *Curr. Mol. Pharmacol.* 1, 80–92.

- Vissers, M.C.M., Gunningham, S.P., Morrison, M.J., Dachs, G.U., Currie, M.J., 2007. Modulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cultured primary cells by intracellular ascorbate. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 765–772, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.023>.
- Vuyyuri, S.B., Rinkinen, J., Worden, E., Shim, H., Lee, S., Davis, K.R., 2013. Ascorbic acid and a cytostatic inhibitor of glycolysis synergistically induce apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 8, e67081, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067081>.
- Wilson, M.K., Baguley, B.C., Wall, C., Jameson, M.B., Findlay, M.P., 2014. Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* 10, 22–37, <http://dx.doi.org/10.1111/ajco.12173>.
- World Health Organization, n.d. Colorectal Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [WWW Document]. URL [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) (accessed 09.09.14.).
- 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. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 592–597.
- Yip, K.W., Reed, J.C., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27, 6398–6406, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.307>.





This article was downloaded by: [Dr Ana Catarina Mamede]

On: 13 September 2012, At: 12:55

Publisher: Routledge

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Nutrition and Cancer

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/hnuc20>

### Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies

Ana Catarina Mamede <sup>a b c</sup>, Ana Salomé Pires <sup>a d</sup>, Ana Margarida Abrantes <sup>a c</sup>, Sónia Dorilde Tavares <sup>a c d</sup>, Ana Cristina Gonçalves <sup>c e</sup>, João Eduardo Casalta-Lopes <sup>a</sup>, Ana Bela Sarmiento-Ribeiro <sup>c e</sup>, Jorge Manuel Maia <sup>f</sup> & Maria Filomena Botelho <sup>a c</sup>

<sup>a</sup> Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>b</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>c</sup> Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>d</sup> Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>e</sup> Applied Molecular Biology and Hematology Group, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>f</sup> Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Version of record first published: 13 Sep 2012.

To cite this article: Ana Catarina Mamede, Ana Salomé Pires, Ana Margarida Abrantes, Sónia Dorilde Tavares, Ana Cristina Gonçalves, João Eduardo Casalta-Lopes, Ana Bela Sarmiento-Ribeiro, Jorge Manuel Maia & Maria Filomena Botelho (): Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies, *Nutrition and Cancer*, DOI:10.1080/01635581.2012.713539

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.713539>



PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

# **Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies**

## **Ana Catarina Mamede**

*Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, and Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **Ana Salomé Pires**

*Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, and Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **Ana Margarida Abrantes**

*Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, and Centre of Investigation on Environment, Genetics, and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **Sónia Dorilde Tavares**

*Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; and Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **Ana Cristina Gonçalves**

*Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, and Applied Molecular Biology and Hematology Group, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **João Eduardo Casalta-Lopes**

*Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **Ana Bela Sarmento-Ribeiro**

*Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, and Applied Molecular Biology and Hematology Group, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

## **Jorge Manuel Maia**

*Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal*

## **Maria Filomena Botelho**

*Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, and Centre of Investigation on Environment, Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

---

Submitted 18 April 2012; accepted in final form 13 July 2012.

The first and second authors contributed equally to this work.

Address correspondence to Ana Catarina Mamede, Biophysics Unit, Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Institute of Biomedical Research on Light and Image (IBILI), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celas 3000-548, Coimbra, Portugal. Tel: +351239480240. Fax: +351239480258. Email: ana.mamede@hotmail.com

Vitamin C, available in its reduced form (ascorbic acid; AA) and in its oxidized form (dehydroascorbic acid; DHA), may act in physiological conditions as an antioxidant or pro-oxidant. The aim of this study is to evaluate the cytotoxic effects of pharmacological doses of AA in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr) *in vitro*, through spectrophotometry, clonogenic assays and flow cytometry, and *in vivo* with xenotransplanted Balb/c nu/nu mice. The results show that the reduced form of vitamin C induces an anti-proliferative and cytotoxic effect in adenocarcinoma colorectal cells under study. The results obtained *in vivo* after treatment with AA showed a large reduction in the rate of tumor growth. Such understanding can guide decisions about which colorectal cancer patients might potentially benefit from vitamin C pharmacologic therapy.

## INTRODUCTION

In the past years, the number of patients affected by colorectal cancer has increased around the world and is now one of the leading causes of death in most developed countries. Risk factors for colorectal cancer are dependent on the region and even within countries because diet, lifestyle, and some hereditary factors may determine the incidence and prevalence of this pathology. In recent years, had been enormous research advances and huge improvements in the treatment of cancer; however, it is necessary to further develop additional and innovative approaches to treat this health problem (1–3).

Over the past few years, many studies have been carried out using cultured cells, animal models or patients to study vitamin C effect on tumor cells. Vitamin C, a lactone isolated in 1928 by Szent-Gyorgyi, is obtained by the human body from exogenous sources, notably in fresh fruits and vegetables, and is available in its reduced form (ascorbic acid; AA) and in its oxidized form (dehydroascorbic acid; DHA). The conversion reaction of AA to DHA, mediated by the reductase enzyme, is a process that generates free radicals and can promote the reduction or oxidation of a system. The molecular structure of AA and DHA, whose effects on cells are distinct, are similar to glucose because of multiple hydroxyl groups close to each other, as represented in Fig. 1 (4–7).

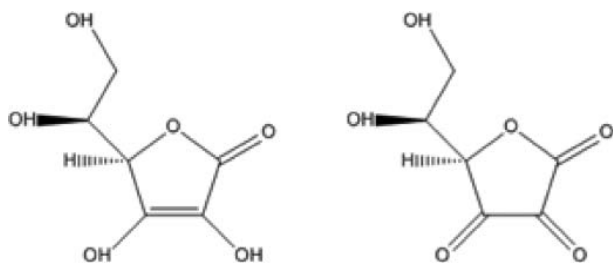


FIG. 1. Chemical structure of ascorbic acid (left) and dehydroascorbic acid (right).

The history of vitamin C in cancer is highly controversial (8). As a result of this controversy, the therapeutic effect of vitamin C has been discredited for years. Currently, new knowledge of pharmacokinetics and pharmacodynamics of vitamin C have stimulated interest in the reevaluation of its application in the prevention and treatment of cancer (9–13). As an antioxidant, the main role of vitamin C is to neutralize free radicals because they need a pair of electrons to achieve its stability. As vitamin C is an excellent source of electrons, it can donate them to free radicals, reflecting its reduction capacity and decreasing oxidative stress. Vitamin C also acts as a prooxidant molecule, promoting the formation of reactive oxygen species (ROS) that impair cell viability. On the other hand, most tumor cells can't transport AA directly to its interior, the reason why the cells obtain vitamin C in its oxidized form, DHA. As mentioned above, tumor cells also show another peculiarity: the decrease of several antioxidant enzymes in relation to normal cells. Consequently, the increased production of hydrogen peroxide, coupled with the breakdown of the activity of antioxidant enzymes in cancer cells and the presence of transition metals, may result in the selective cytotoxicity of vitamin C and the subsequent revelation of its therapeutic potential (12).

Oxidative stress is a biochemical condition characterized by the imbalance between the presence of relatively high levels of toxic reactive species, especially ROS, and the antioxidative defence mechanisms. ROS are products of normal cellular metabolism and can be defined as organic/inorganic molecules containing one or more unpaired electrons in atomic or molecular orbitals that can damage cell at different levels. ROS, such as hydrogen peroxide, superoxide radical, hydroxyl radical, and singlet oxygen, are highly reactive and can be produced from both endogenous and exogenous substances. Potential endogenous sources include mitochondria, cytochrome P450 metabolism, peroxisomes, and inflammatory cell activation. Exogenous factors include environmental agents and several modifiable factors such as diet, medications, and lifestyle. At high concentrations, ROS can be important mediators of damage to cell structures, like nucleic acids, lipids, and proteins, affecting enzyme activity, altering membrane function and modulating expression of genes that regulate cell differentiation and growth. On the other hand, at low/moderate concentrations, ROS are essential for life because of their role in many vital processes such as signal transduction, bactericidal activity of phagocytes, and induction of mitogenic responses (14–20).

Therefore, the aims of this work are to study the selective cytotoxicity of the reduced form of vitamin C and see how a human colorectal adenocarcinoma cell line is affected by this powerful antioxidant/prooxidant molecule through the evaluation of cell proliferation by spectrophotometry, clonogenic assays, and flow cytometry. *In vivo* studies with xenotransplanted Balb/c nu/nu mice, to verify the anticarcinogenic effect of AA, were performed.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell Culture

Human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr), acquired from American Type Culture Collection (Rockville, MD), was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma D-5648) supplemented with 100  $\mu$ M sodium pyruvate (Gibco 11360), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco 2010-09), and 1% antibiotic/antimycotic (100 U/mL penicillin and 10  $\mu$ g/mL streptomycin, Gibco 15140-122). Cells were maintained at 37°C with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell Proliferation

To evaluate the effect of AA (Sigma A5960) in cell proliferation, we used the colorimetric test MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The dehydrogenase enzymes, present in metabolically active cells, have the ability to cleave the tetrazolium ring of MTT and form dark blue formazan crystals that can subsequently be solubilized and quantified by spectrophotometry (21,22). For each experiment, cells were plated in 24 multiwells in a concentration of 50,000 cells/mL and kept in the incubator overnight to allow the cells attachment. After incubating cells with different AA concentrations during 1 and 4 h, the culture medium was replaced. After 24, 48, 72, and 96 h of rest, cell proliferation was evaluated: culture medium was removed, 900  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS) was added, and then a 150  $\mu$ L of solution of MTT (5 mg/mL; Sigma M2128) in PBS. After 3 h, a 150  $\mu$ L of solution of isopropanol (Sigma 279544) in 0.04M hydrochloric acid (Sigma H1758) was added and the cells were resuspended. The contents of each well were transferred to a plate with 96 wells and the absorbance was quantified at 570 nm with a reference filter of 620 nm in an ELISA spectrophotometer (SLT-Spectra). The obtained results were analyzed and processed in software OriginPro 8.0, being the cytotoxicity expressed as the percentage of inhibition of cell proliferation correlated with control experiments. This allows the determination of the AA concentration that inhibits the culture cell proliferation in 50% (IC<sub>50</sub>) through sigmoid fitting (Boltzman function). Each experiment was performed in duplicate and repeated in 3 different sets of tests.

### Clonogenic Assay

Clonogenic assay aims to determine cell survival based on the ability of a single cell to grow and form a colony after the cells are subjected to the action of AA. For this study, 500 cells were seeded per well and after 24 h were incubated with AA at different concentrations. Two hours after exposure to vitamin C, cells were washed with PBS and new medium was added. After 5 days, the medium was changed and at tenth day the colonies were visualized. Culture medium was aspirated, cells were washed with PBS, and methanol (Sigma 34860) was added to fix the colonies, a procedure that was repeated twice. After the plates have dried, the crystal violet dye (Sigma M2128; 0.5% diluted in methanol) was added. Subsequently, the plates were washed with warm water and allowed to dry, after which the

number of colonies were counted and the plate efficiency and survival factor determined.

$$\text{Plate efficiency}\% = \frac{\text{Number of counted colonies}}{\text{Number of seeded colonies}} \times 100$$

$$\text{Survival factor}\% = \frac{\text{Plate efficiency of treated samples}}{\text{Plate efficiency of control samples}} \times 100$$

### Flow Cytometry

To study/characterize the redox intracellular environment after incubation of AA at different concentrations, we determined by flow cytometry the cell viability, the ROS production, the expression of reduced glutathione (GSH) and the changes of mitochondrial membrane potential. The analysis was performed using a 6 parameter, 4-color FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 15 nW argon laser. For each assay, at least 10<sup>4</sup> events was collected using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) and analyzed using Paint-a-Gate software (Becton Dickinson, San Jose, CA). For flow cytometry analysis, 10<sup>6</sup> cells were seeded per well and after 24 h were incubated with AA at different concentrations. One hour after exposure to vitamin C, cells were washed with PBS and new medium was added. After 24 h, cells were examined by flow cytometry.

### Cell Viability

To evaluate cell viability, annexin-V/propidium iodide (AV/PI) incorporation assay was used. One of the main features of cell death by apoptosis is the redistribution of plasma membrane phosphatidylserine, a phospholipid that, in apoptotic cells, is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasmatic membrane and binds to AV. Complementarily, PI, which does not permeate viable cells, binds to deoxyribonucleic acid (DNA) intercalating between the bases on late apoptotic and necrotic cells (23). In this assay, 10<sup>6</sup> cells were incubated during 15 min in binding buffer with 1  $\mu$ L of AV (Kit Immunotech, Marseille, France) and 5  $\mu$ L of PI (Kit Immunotech, Marseille, France). Subsequently, cells were excited at a wavelength of 525 nm for AV and 640 nm for PI, collecting 10<sup>4</sup> events to assess the percentage of viable, early apoptotic, late apoptotic/necrotic, and necrotic cells (24).

### Detection of Intracellular Peroxides

2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA), a lipid permeable and non-fluorescent compound, is cleaved by intracellular esterases by entering cells and leads to 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH<sub>2</sub>). In the presence of peroxides, DCFH<sub>2</sub> is oxidated with formation of dichlorofluorescein (DCF), a highly green fluorescent compound. The emitted fluorescence is proportional to the concentration of intracellular peroxides (25). A cell suspension of 10<sup>6</sup> cells was incubated with 5  $\mu$ M of DCFH<sub>2</sub>-DA (Sigma D6883) for 1 h at 37°C in

the dark. After washing the cells with PBS, the analysis was performed with an excitation wavelength of 504 nm, being the emission wavelength 529 nm. The results are presented as mean fluorescence intensity (MFI) values.

#### Detection of Superoxide Radical

Dihydroethidium (DHE) easily crosses cell membranes and is converted by superoxide radical to ethidium, a red fluorescent compound that merges the DNA remaining inside the cell (26). A cell suspension of  $10^6$  cells was resuspended in PBS and incubated with 5  $\mu$ M of DHE (Sigma 37291) dissolved in DMSO (Sigma D8418) for 10 min at 37°C in the dark. After washing the cells with PBS, the analysis was performed with an excitation wavelength of 620 nm. Results are presented as MFI values.

#### GSH Expression

The expression of GSH, an antioxidant defence, was performed by flow cytometry using the fluorescent compound mercury orange. This compound binds stoichiometrically to mercurial sulfhydryl groups with the formation of fluorescent ducts. However, this compound faster reacts with GSH than with the sulfhydryl groups of proteins and the reaction product emits an intense red fluorescence when excited with an argon laser at a wavelength of 488 nm (27). A cell suspension of  $10^6$  cells was incubated with 4  $\mu$ L of mercury orange (Sigma 83377) in acetone (Sigma 650501) for 15 min at room temperature in the dark. After washing the cells with PBS, the analysis was performed with an excitation wavelength of 620 nm. Results are presented as MFI values.

#### Mitochondrial Membrane Potential Measurement

The lipophilic cationic 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) is a molecule able to selectively enter the cell and which exists in 2 forms, monomers (M) and aggregates (A), depending on the state of polarization/depolarization of the mitochondrial membrane. When the membrane potential is high, the JC-1 forms aggregates that emit red fluorescence (590 nm). In turn, as the mitochondrial membrane potential decreases or in cases where the membrane is depolarized, JC-1 is excluded from mitochondria and remains in the cytoplasm in the form of monomers that emits green fluorescence (529 nm). Thus, the ratio between the intensities of green and red fluorescence (M/A), determined by flow cytometry, provides an estimate of mitochondrial membrane potential (28). To perform JC-1 (Invitrogen, T-3168) incorporation, the cells were incubated at a final concentration of 5 mg/mL in DMSO during 15 min at 37°C in the dark. Subsequently, the cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry. The results are presented as aggregate/monomer fluorescence intensities ratio.

#### In Vivo Studies

In order to verify the reduction of tumor growth rate after the daily injection of AA in mice, it was developed a methodology to evaluate in vivo the role of vitamin C reduced form in cancer. Thus,  $8 \times 10^6$  WiDr cells were inoculated on the back of *Balb/c nu/nu* mice and, during several days, the body weight of mice and tumor size were monitored, as well as the behavior and general health of the mice. When tumor volume reached 300–500 mm<sup>3</sup>, an aqueous solution of AA with a concentration of 150 mg/kg was daily injected intraperitoneally during 12 days. Tumor volume was estimated according to Dargosa et al. (29). After therapy, the mice were killed by cervical dislocation. In this experience, AA was not administered to control animals. During experiments, animals were kept in filtertop cages under constant temperature and humidity and maintained on sterilized diet and water ad libitum. The animals were kept under sterile conditions in cycles of 12 h of dark/light.

#### Statistical Analysis

Results were analyzed using the software PASW (Predictive Analysis SoftWare) version 18. In comparison of all the conditions we used the Kruskal-Wallis test, whereas comparisons 2-by-2 were made with the Mann-Whitney test. A significance level of 5% ( $P < 0.05$ ) was considered for all comparisons. The in vivo results were analyzed through a prospective study, in which the estimation of Kaplan-Meier to construct survival curves was made. We considered that an event occurred if the tumor volume was 3 times the initial volume. The curves were compared using the log-rank test and a significance level of 2% ( $P < 0.02$ ) was considered.

#### RESULTS

To evaluate the effects of vitamin C in WiDr cells, we examined the effect of AA at different concentrations and for different periods of incubation and rest in the proliferation of cells using MTT assay. Table 1 represents the biological response of WiDr cells after 1 and 4 h of exposure to AA with 24, 48, 72, and 96 h of cellular rest. As can be seen in Table 1, exposure of WiDr cells to AA for 1 h results in an IC<sub>50</sub> equal to 20.4 mM after 24 h of rest, being registered a slight increase in IC<sub>50</sub> value at 48 h of rest (25.1 mM). After 1 h of incubation with AA and 72 and 96 h of rest, there was an IC<sub>50</sub> value equal to 18.5 mM and 4.54 mM, respectively. On the other hand, when cells are exposed to AA for 4 h, there is a decrease in the IC<sub>50</sub> value registered for all times of rest: 4.36 mM (24 h), 5.8 mm (48 h), 3.85 mM (72 h), and 1.73 mM (96 h).

Clonogenic assays are an asset to test the cytotoxicity of vitamin C as they allow one to analyze the effects of AA in cells after a long period of time and determine the outcome of the vitamin C on cells. Through this technique, it was observed that as the concentration of AA increases, the survival factor of cells significantly decrease ( $P < 0.05$ ), as can be seen in Fig. 2. When cells are treated with a concentration of 0.5 mM, there

TABLE 1  
Half maximal inhibitory concentration of human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr) cells after exposure to ascorbic acid

Exposure time (h)	Rest time (h)	IC <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>
1	24	20.40	0.96
	48	25.10	0.82
	72	18.50	0.98
	96	4.54	0.93
4	24	4.36	0.93
	48	5.80	0.91
	72	3.85	0.93
	96	1.73	0.99

WiDr cells were exposed to AA for 1 or 4 h and after 24, 48, 72, and 96 h of cellular rest, cellular proliferation was calculated. IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) were obtained using the equation of the sigmoid fitted curves (Boltzman function). R<sup>2</sup> is the coefficient of determination of the fitted curves. Each experiment was performed in duplicate and repeated in three independent sets of tests.

is a reduction factor of survival of 44.88% relatively to control. At concentrations of 2, 3, and 5 mM, the reduction of survival factor is more marked, being always above 80%.

The assessment of cell viability was performed by flow cytometry using the AV/PI incorporation assay. This technique allows one to distinguish different cell populations: viable cells (VC), cells in early apoptosis (EAC), cells in late apoptosis/necrosis (LAC/NC) and necrotic cells (NC). Cytometry studies show that as the concentration of AA increases, cell death also increases, as shown in Fig. 3. Thus, AA induces a statistically significant decrease ( $P < 0.05$ ) in cell viability in a dose-dependent way. Note that, at a concentration of 45 mM,

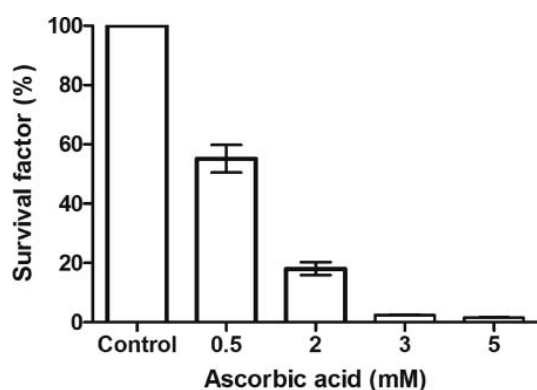


FIG. 2. Survival factor of human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr) cells after treatment with ascorbic acid. The cells were exposed to different concentrations of AA (0.5, 2, 3, and 5 mM) and were subsequently observed the formation of colonies by the crystal violet dye. The results represent the average of 3 independent studies  $\pm$  standard deviation.

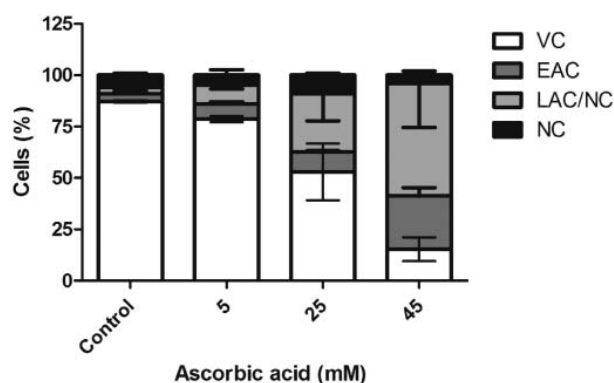


FIG. 3. Cell viability by flow cytometry using dual staining with AV and PI. Figure represents the percentage of viable cells (VC), in early apoptosis (EAC), in late apoptosis/necrosis (LAC/NC), and necrosis (NC) after treatment with ascorbic acid. The results express the average of 3 independent experiments  $\pm$  standard deviation.

cell death reaches 86%, being 26% attributed to the early apoptosis, 56% to late apoptosis/necrosis and 4% to necrosis.

Given the importance that the ROS may have in the mechanisms of cytotoxicity of vitamin C, it was determined the expression of peroxides and superoxide radical. As can be seen in Fig. 4, there is an increase in the intracellular production of peroxides when cells are treated with 5 and 25 mM of AA. When these cells are exposed to 45 mM, the production of peroxide decreases to about half of the value recorded for control. In the comparison of all the conditions, it was found that there are significant differences ( $P < 0.05$ ).

To evaluate the production of superoxide radical, we resort to DHE and the respective analysis of the fluorescence intensities

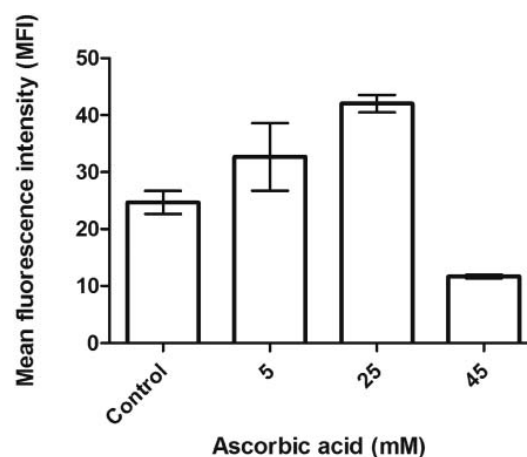


FIG. 4. Production of peroxides by flow cytometry using DCFH<sub>2</sub>-DA. The cells were treated with ascorbic acid and subsequently the production of peroxides was detected. The results are expressed as mean fluorescence intensity and express the average of 3 independent experiments  $\pm$  standard deviation.

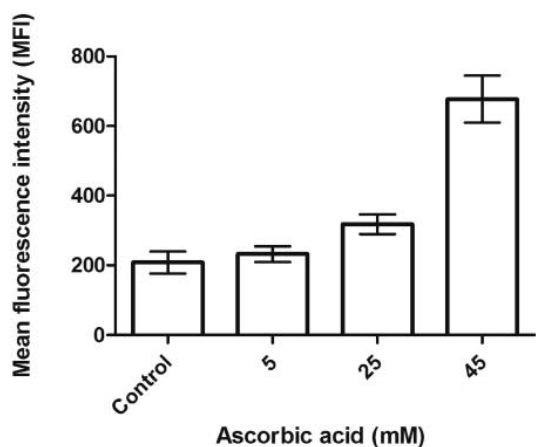


FIG. 5. Production of superoxide radical by flow cytometry using DHE. The cells were treated with ascorbic acid and subsequently the production of superoxide radical was detected. The results are expressed as MFI and express the average of 3 independent experiments  $\pm$  standard deviation.

by flow cytometry. From the analysis of Fig. 5, it is possible to observe that, as the concentration of AA increases, the production of superoxide also increases. It should be noted that this statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) is very pronounced when the cells are incubated with 45 mM (superoxide production is almost 4 times higher than the control).

To evaluate the expression of intracellular GSH, we used the orange mercury probe and the analysis of fluorescence intensities were performed by flow cytometry. Through the analysis of the Fig. 6, we can see that when cells are incubated with AA, the expression of GSH increases in a statistically significant way ( $P < 0.05$ ) relatively to control. It should be noted that there

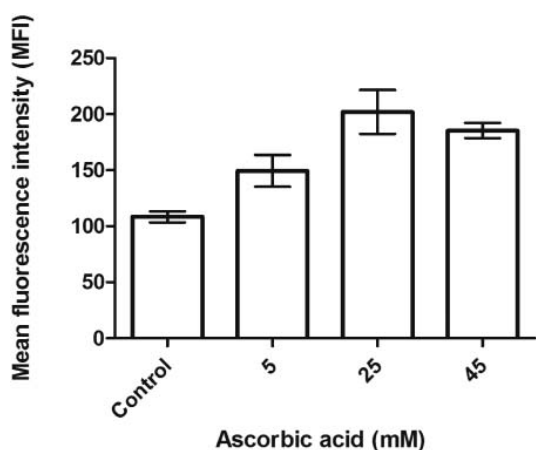


FIG. 6. Expression of GSH by flow cytometry using orange mercury. The cells were treated with ascorbic acid and subsequently the expression of GSH was detected. The results are expressed as MFI and express the average of 3 independent experiments  $\pm$  standard deviation.

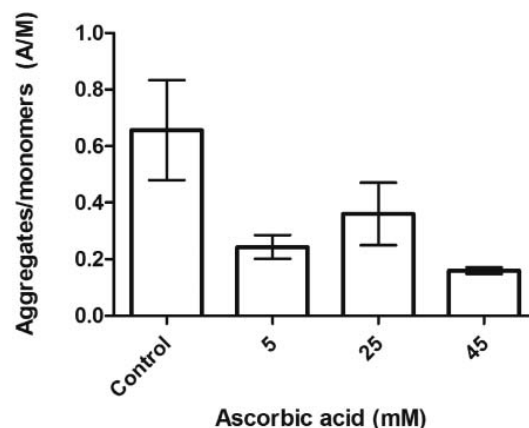


FIG. 7. Analysis of mitochondrial membrane potential by flow cytometry using the fluorescent probe JC-1. The cells were treated with ascorbic acid and subsequently the mitochondrial membrane potential was detected. The results are expressed as the ratio between aggregates and monomers and express the average of 3 independent experiments  $\pm$  standard deviation.

is a slight decrease in expression of GSH (about 8% less) at a concentration of 45 mM when compared to concentration of 25 mM.

Fig. 7 shows the ratio between aggregates and monomers (A/M) in WiDr cells after treatment with AA. As we can see, there is a marked decrease in mitochondrial membrane potential in WiDr incubated with AA compared to control, which is more relevant at concentration of 45 mM. Statistical analysis of these data showed no statistically significant differences for 5, 25, and 45 mM.

With regard to *in vivo* studies, and as represented in Fig. 8, there are significant differences between the 2 groups (control and under treatment) with respect to achieve a relative volume of 3 (log-rank test,  $P = 0.002$ ). Half of the sample reached this volume controls on the 4th day, whereas half of the controls reached this value at 12 days. Not all mice in the latter group reached the relative volume considered. Note that no changes were recorded in animal weight over time.

## DISCUSSION

Vitamin C is a nutrient whose benefits are long been known and widely disseminated, being the majority because of its antioxidant action. However, some studies suggest that this nutrient may have a preventive and therapeutic role in cancer disease because of its potential prooxidant activity, promoting the formation of ROS that induce selectively cancer cell death. Because of the discussion that remains in the scientific community about the benefits/harms of large doses of vitamin C in the prevention and treatment of cancer, it is imperative to carry out more studies to infer the true function of this antioxidant/prooxidant in human health and disease. This study aimed to evaluate the mechanisms of action of vitamin C

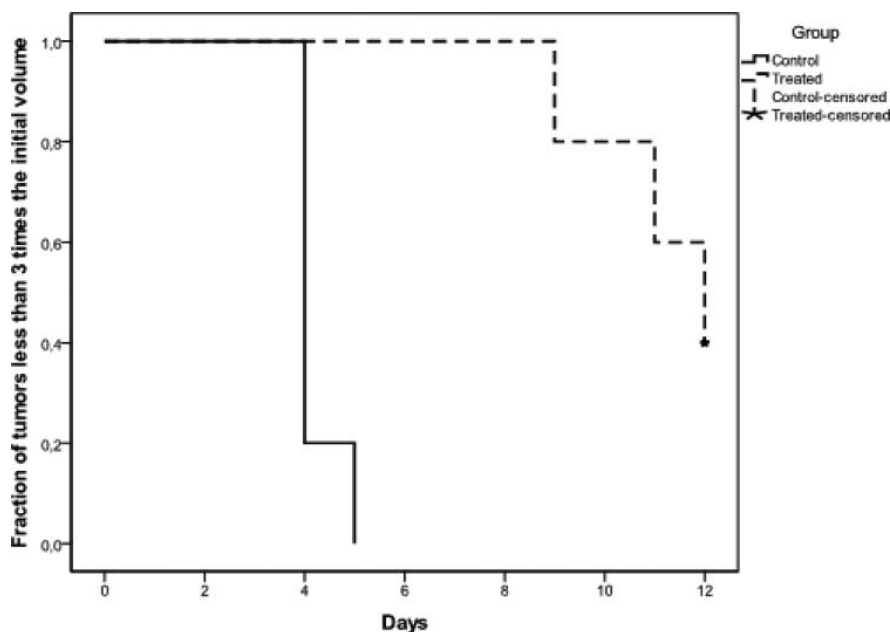


FIG. 8. Evolution of tumor growth over 12 days of therapy with ascorbic acid (AA). Over 12 days, Balb/c nu/nu xenografts were subjected to intraperitoneal therapy with AA. Xenotransplanted Balb/c nu/nu not treated with AA was used as a control. The results represent the average of 5 control mice and 5 mice that undergo therapy.

through various techniques, seeking results that represent an asset for the assessment of the applicability of vitamin C in cancer disease.

According to the results obtained by the MTT assay, we can see that when WiDr cells are exposed to AA for 1 h and allowed to rest for 24, 48, 72, or 96 h, the recorded  $IC_{50}$  decreases progressively as the rest time increases. The same behavior was observed when the cells are left in contact with AA for 4 h. However, there are notable differences in the value of  $IC_{50}$  obtained for all times of rest, being always much smaller for incubation times of 4 h when compared with incubation times of 1 h. When cells are incubated for 1 and 4 h and allowed to stand 48 h, there is a slight increase in value when compared with the  $IC_{50}$  value obtained for the 24 h. This behavior can be a sign that the amount of drug that penetrates in the cell was not enough to reduce cell proliferation but rather to trigger some mechanism of resistance to AA at 48 h.

To confirm and reinforce the results obtained by the method of MTT, several assays were performed to analyze the reproductivity of the cell death results. That is, it was determined if the cell had long-term capacity to proliferate after treatment with different concentrations of AA in the range 0.5–5 mM. These studies, called by clonogenic assays, allow verifying the marked reduction of survival factor of WiDr cells after treatment with AA. These studies let assessing the longer-cell responses after treatment with AA, unlike the MTT technique, which only allow to evaluate the response of cells to certain drugs over short periods of time. By the results obtained by the clonogenic as-

says, it appears that the cells lose their reproductive capacity as the concentration of AA increases.

After confirming the reduction of proliferation and cell survival in the cell line under study, it was necessary to understand the cellular mechanisms through which these effects appear. For that, we used the flow cytometry technique, which allows us to analyze cell viability by double staining with AV/IP, the presence of ROS by staining with DCFH<sub>2</sub>-DA and DHE, the expression of intracellular GSH through the orange mercury staining, and the alteration of mitochondrial membrane potential through the fluorochrome JC-1. AV/PI assay allow the assessment of cell viability and distinguishes different types of cell death. Thus, this double staining showed that as the concentration of AA increases the cell death in WiDr also increased, with the majority of cell death occurring by late apoptosis or necrosis.

One mechanism that has been suggested for the selective cytotoxic effect of vitamin C in tumor cells involves oxidative stress (30,31). Thus, an increase of oxidative stress coupled with a decrease of the antioxidant enzyme by a factor of 10 to 100, as well as an increase of transition metals and the oxidation of AA to DHA in tumor cells, can lead to selective cytotoxicity in this type of cells. Because ROS play an important role in the cytotoxic action of vitamin C, we resorted to the use of 2 specific probes for the detection of peroxides and superoxide radical, the DCFH<sub>2</sub> and DHE, respectively. Analyzing the results obtained, it was found that when WiDr cells are exposed to 45 mM of AA the production of hydrogen peroxide is lower, whereas the production of superoxide radical is higher relatively to the



control. The concentration of 25 mM of AA in WiDr induces an increase of this 2 reactive oxygen species, whereas for the concentration of 5 mM there is only a slight increase compared to control. Besides the cytotoxicity, with high concentrations of vitamin C it was also observed a marked decrease in the levels of peroxides, suggesting a conversion into more cell damaging species, as the hydroxyl radical or the nitrite peroxide.

Although these reactive species were not measured, this can be a reasonable justification because in the presence of free iron, the hydrogen peroxide is converted by the Fenton-Haber Weiss reaction into hydroxyl radical, and the superoxide anion in the presence of nitric oxide can be converted into nitrite peroxide. These species are highly reactive and toxic to the cell, leading to cell death. Because the detection of superoxide anion by the probe DHE is a relatively specific reaction, this probe can also detect nitrite peroxide. The increase of fluorescence intensity detected after incubation of WiDr to 45 mM of AA, could in fact be due to the presence of reactive nitrogen species. Note that, as higher the production of reactive species, higher the cell death, as confirmed by linking the results obtained by flow cytometry.

To ascertain the level of the antioxidant defences present in tumor cells, it was analyzed by flow cytometry the expression of intracellular GSH using as fluorescent probe, the orange mercury. Knowing that GSH is a reducing agent of peroxides, it is expected that as greater the production of hydrogen peroxide, the greater the expression of intracellular GSH. Thus, after exposure of WiDr to 45 mM of AA, the expression of intracellular reduced glutathione is higher relatively to the control despite the decrease of hydrogen peroxide, as stated above. The explanation for this could be the rapid conversion of hydrogen peroxide to other damaging reactive species.

To confirm the involvement of mitochondria in the biological effects of vitamin C, we evaluate the mitochondrial membrane potential with JC-1 probe. Our studies are consistent with the foregoing and confirm the results obtained in the studies of proliferation, observing a decrease in the ratio A/M under conditions in which vitamin C induced cell death in WiDr cells. However, statistical analysis of these data showed no statistically significant differences for 5, 25, and 45 mM.

To finalize this study, the authors developed a methodology that allowed to study *in vivo* the role of vitamin C in cancer disease by reducing the rate of tumor growth after daily intraperitoneal injection of AA. Several pharmacokinetic studies have clearly demonstrated that vitamin C concentrations in plasma and tissues are tightly controlled in terms of ingesta, because the oral route of administration is limited by the elimination of vitamin excess by the urinary system. As a consequence, oral administration of vitamin C cannot achieve plasma concentrations greater than 50–100  $\mu\text{M}$  and for this reason, oral supplementation of vitamin C appears to have no influence on the treatment of cancer patients. Thus, by studying the best way to administrate AA to *Balb/c nu/nu*, we did not consider the oral route. Of the 3 possible routes, the intravenous was ideal due

to much higher plasma concentrations of vitamin C obtained (6,32). However, given the frailty of the tail vein of the mice used and the need of a daily injection of AA, we preferred the administration through the intraperitoneal route. From the results, it can be seen that tumor growth in mice undergoing therapy has stagnated, while tumor growth at the control mice continued to increase, a fact which shows that AA may have an effective role in the approach to treatment as is widely uptaken by tumor cells. Verrax and Calderon (33) also conducted a study involving the daily administration of AA to xenotransplanted animals with hepatocellular carcinoma cells and also found that the rate of tumor growth decreased over thirty days. Yeom et. al. (34) also reported that administration of a high concentration of AA inhibits tumor growth in *Balb/c* mice implanted with sarcoma 180 cancer cells through the restriction of angiogenesis.

## CONCLUSION

In this work, which main objective was to contribute to the clarification of the mechanisms of action of vitamin C in cancer, we can draw several conclusions. For *in vitro* studies conducted in colorectal adenocarcinoma cells, its main objective was to evaluate the anti-proliferative and cytotoxic effects of vitamin C. From our results, we can conclude that the reduced form of vitamin C induces an inhibitory effect on the cell line studied. This anti-proliferative effect is associated with a cytotoxic effect due to the decreased cell viability and consequent increase in cell death by apoptosis/necrosis. This cytotoxic effect of AA may be related to the production of ROS, including the conversion of peroxides in more reactive and toxic species, such as the hydroxyl radical and nitrite peroxide, which is consistent with cell death by late apoptosis/necrosis observed. Mitochondrial dysfunction is another mechanism that is related to oxidative stress and can contribute to the cytotoxic effect of high concentration of vitamin C in colorectal adenocarcinoma cells. Finally, it was proven *in vivo* that the reduced form of vitamin C stabilizes tumor growth and may contribute for cancer therapy.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CIMAGO (Center of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology) and Faculty of Medicine of the University of Coimbra for all the support given to this work.

## REFERENCES

1. Winawer SJ: The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Colorectal cancer screening. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* **21**, 1031–1048, 2007.
2. Potter JD: Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 916–932, 1999.
3. Center M.M, Jemal A, and Ward E: International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **18**, 1688–1694, 2009.

4. Lee KW, Lee HJ, Surh Y-J, and Lee CY: Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *American Journal of Clinical Nutrition* **78**, 1074–1078, 2003.
5. Deutsch JC: Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography* **881**, 299–307, 2000.
6. Iqbal K, Khan A, and Khattak M: Biological Significance of ascorbic acid (vitamin c) in human health: a review. *Pakistan Journal of Nutrition* **3**, 5–13, 2004.
7. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, et al.: Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition* **22**, 18–35, 2003.
8. Mamede A, Tavares S, Abrantes A, Trindade J, Maia J, et al.: *The role of vitamins in cancer. Nutrition and Cancer* **63**, 479–494, 2011.
9. Padayatty SJ and Levine M: New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *Canadian Medical Association Journal* **164**, 353–355, 2001.
10. Li Y and Schellhorn HE: New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of Nutrition* **137**, 2171–2184, 2007.
11. Padayatty SJ and Levine M: Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. *Journal of the American College of Nutrition* **19**, 423–425, 2000.
12. Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, et al.: Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *Canadian Medical Association Journal* **174**, 937–942, 2006.
13. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, et al.: Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13604–13609, 2005.
14. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, et al.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44–84, 2007.
15. Fruehauf JP and Meyskens FL: Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical Cancer Research* **13**, 789–794, 2007.
16. Orrenius S, Gogvadze V, and Zhivotovsky B: Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47**, 143–183, 2007.
17. Valko M., Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1–40, 2006.
18. Ozben T: Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 2181–2196, 2007.
19. Ames BN, Shigenaga MK, and Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 17, 7915–7922, 1993.
20. Goodman M, Bostick RM, Dash C, Flanders WD, and Mandel JS: Hypothesis: oxidative stress score as a combined measure of pro-oxidant and antioxidant exposures. *Annals of Epidemiology* **17**, 394–399, 2007.
21. Mosmann T: “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63, 1983.
22. Casalta-Lopes J, Abrantes AM, Laranjo M, Rio J, Gonçalves AC, et al.: Efflux pumps modulation in colorectal adenocarcinoma cell lines: the role of nuclear medicine. *Journal of Cancer Therapy* **2**, 408–417, 2011.
23. Aubry J-P, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, et al.: Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* **37**, 197–204, 1999.
24. Abrantes AM, Serra ME, Gonçalves AC, Rio J, Oliveiros B, et al.: Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with 99mTc-MIBI and 99mTc-HL-91 uptake in colon cancer cells. *Nuclear Medicine and Biology* **37**, 125–132, 2010.
25. Halliwell B and Whiteman M: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* **142**, 231–255, 2004.
26. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokolowski EA, Levine RL, et al.: Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5727–5732, 2005.
27. O'Connor JE, Kimler BF, Morgan MC, and Tempas KJ: A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange. *Cytometry* **9**, 529–532, 1988.
28. Yao J, Jiang Z, Duan W, Huang J, Zhang L, et al.: Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **31**, 592–597, 2008.
29. Dargosa M, et al.: Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **57**, 1084–1092, 2003.
30. Arrigoni O, and De Tullio MC: Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1569**, 1–9, 2002.
31. Giommarelli C, Corti A, Supino R, Favini E, Paolicchi A, et al.: Cellular response to oxidative stress and ascorbic acid in melanoma cells over-expressing gamma-glutamyltransferase. *European Journal of Cancer* **44**, 750–759, 2008.
32. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, et al.: Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 18982–18989, 1997.
33. Verrax J and Calderon PB: Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radical Biology & Medicine* **47**, 32–40, 2009.
34. Yeom C-H, Lee G, Park JH, Yu J, Park S, et al.: High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis. *Journal of Translational Medicine* **7**, 70, 2009.

## Radiolabelling of Ascorbic Acid: A New Clue to Clarify its Action as an Anticancer Agent?

A.C. Mamede<sup>1,2,3</sup>, A.M. Abrantes<sup>1,3</sup>, A.S. Pires<sup>1,4</sup>, S.D. Tavares<sup>1,3,4</sup>, M.E. Serra<sup>5</sup>, J.M. Maia<sup>6</sup> and M.F. Botelho<sup>\*,1,3</sup>

<sup>1</sup>Biophysics/Biomathematics Institute, IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; <sup>2</sup>CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal; <sup>3</sup>Centre of Investigation on Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; <sup>4</sup>Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; <sup>5</sup>Chemistry Department, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; <sup>6</sup>Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

**Abstract:** Vitamin C exists in two forms: the reduced (ascorbic acid - AA) and oxidized form (dehydroascorbic acid - DHA). This is a nutrient whose benefits are long known and widely publicized, being most of them related to its antioxidant action. As an antioxidant, the main role of vitamin C is to neutralize free radicals, reducing 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 increase of compartmentalized transition metals in tumor cells may result in the selective cytotoxicity of vitamin C and the subsequent revelation of its therapeutic potential.

In this way the first purpose of this work was radioactively label the reduced form of vitamin C with Tc-99m, its quality control by HPLC and the time stability. The second purpose was to use the radioactive complex <sup>99m</sup>Tc-AA in *in vitro* and *in vivo* studies in order to evaluate its uptake by colorectal cancer cells and biodistribution in mice, respectively. The results suggest that the pharmaceutical formulation developed, which was reproducible and stable over time, was residually taken up by colorectal cancer cells. Future studies are needed to deepen our understanding about the radioactive complex <sup>99m</sup>Tc-AA and clarify the mechanisms of action of vitamin C in oncologic disease.

**Keywords:** Vitamin C, ascorbic acid, cancer, radiotracer, biodistribution, nuclear medicine.

### 1. INTRODUCTION

Since the 1980's increasing scientific research confirmed that many of the most common diseases of the twenty-first century, such as hypertension, cardiovascular disease, stroke, neurodegenerative disorder or cancer, are associated with acute oxidant states in humans [1, 2]. It is thought that some nutrients can modify the conditions that lead to oxidative stress in the human body by increasing antioxidant capacity and improving the cellular defences against reactive species. The role of vitamin C, one of the most common antioxidants in the human diet, as a therapeutic agent has been an issue of controversy in last decades [2-10].

Vitamin C has two main chemical physiological forms: the reduced form (AA) and the oxidized form (DHA) [3, 11, 12]. The reduced form is the predominant chemical form of vitamin C in human body and is an essential micronutrient involved in many biochemical and biological functions. AA is a specific electron donor for eight enzymes, but also has

non-enzymatic actions in chemical reactions. This form of vitamin C is a weak acid constituted by six carbons and two ionizable groups, with an enediol structure that facilitates the oxidation-reduction by donating or accepting an electron pair (Fig. 1). Under physiological conditions, AA is a potent reducing agent (antioxidant) that efficiently quenches potentially damaging free radicals produced through biological processes in many extracellular and intracellular reactions. Vitamin C also acts as a pro-oxidant, promoting the formation of reactive oxygen species (ROS) that impair cell viability [13-15].

In the last decade, the scientific community showed a growing interest in the application of vitamins as potential agents with preventive and therapeutic action in cancer. With regards to vitamin C, there are no conclusive results up to date. The possible role of vitamin C in cancer therapy is based on the fact that tumor cells do not directly carry the AA to their interior, but get the vitamin C in its oxidized form. Moreover, tumor cells showed a decrease of several antioxidant enzymes compared to normal ones, resulting in an increased production of reactive species inside them. These factors, coupled with the presence of transition metals, can result in selective cytotoxicity of vitamin C and the subsequent revelation of its therapeutic potential [16-18].

\*Address correspondence to this author at the Biophysics/Biomathematics Institute, IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; Tel: +351239480240; Fax: +351239480258; E-mail: filomena@ibili.uc.pt

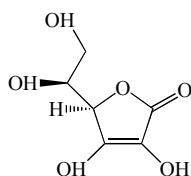


Fig. (1). Chemical structure of AA.

In order to clarify the potential role of vitamin C in cancer, and taking into account the existing practices, developing new techniques to provide information about the metabolism and mechanism of action of vitamin C may be crucial to the understanding of the processes through which it acts. Thus, nuclear medicine can provide a solution to this approach, since by radiolabelling vitamin C we can infer through *in vitro* and *in vivo* studies how it gives the uptake by tumor cells and its biodistribution.

The purpose of this study was to radioactively label the reduced form of vitamin C with technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) in order to obtain the radioactive complex  $^{99m}\text{Tc-AA}$ . Several studies have been carried out in order to study the metabolism of AA by labelling this compound to different radionuclides ( $^3\text{H}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) [19-26]. However, there is practically no information documenting the labelling of AA with  $^{99m}\text{Tc}$ . The labelling of AA with a radionuclide and its application in cancer therapy makes this work innovative because it provides us an imagiologic control of vitamin C effect in tumour cells. After quality control of the obtained radiotracer formulation by high performance liquid chromatography (HPLC),  $^{99m}\text{Tc-AA}$  was used in uptake studies in colorectal cancer cells. Subsequently, *in vivo* studies were performed in *Balb/c* and *Balb/c nu/nu* mice in order to confirm the results obtained in quality control of  $^{99m}\text{Tc-AA}$  and get information about the biodistribution and excretion pathways of the radiotracer developed.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Radiolabelling of Ascorbic Acid

To a 222MBq of sodium pertechnetate on a volume of 1,5mL was added 0,2mL of 0,1N iron III chloride (Sigma, 157740) in hydrochloric acid 0,1N. Subsequently, this solution was added to 200mg of AA (Sigma, A5960) in a vial previously argoned and protected from light. After brief stirring, the pH was brought to 6,5 – 7,0 by adding 1,2 mL of a solution of sodium hydroxide 1M. The pH value was confirmed with pH indicator strips (pH-Fix 4,5-10, Machenerey-Nagel).

### 2.2. Quality Control of $^{99m}\text{Tc-AA}$

To perform quality control, the HPLC that was used contained a Gilson UV/VIS-151 Detector, 321-PUMP and 506-C System Interface. The definition of the methods and results processing was done using software Gina-Star. The HPLC method for quality control of  $^{99m}\text{Tc-AA}$  was developed using as stationary reverse phase a Nucleosil column with a guard column (Hichrom, NC100-5C18), a mobile phase with a gradient of potassium hydrogenophosphate (0,025M, pH 3) and methanol at a ratio of 96/4 (v/v) and the

constant flow of 1mL/min. The UV detection was performed with a wavelength of 210nm. The system was washed for 30 minutes with a mobile phase of methanol and water at a ratio of 90/10 (v/v) at a constant flow of 1 mL/min and a wavelength of 254nm. After stabilization of HPLC system, the quality control was performed at 0, 30, 60, 180, 240 and 360 minutes after the radiolabelling procedure. The evaluation of the performance characteristics of the HPLC system were realized in order to assure the feasibility of our results (data not shown).

### 2.3. Cell Culture

Adenocarcinoma colorectal human cells (WiDr), obtained from American Type Culture Collection (Rockville MD, USA), was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma D-5648) supplemented with 100 $\mu\text{M}$  sodium pyruvate (Gibc, 11360), 10% fetal calf serum (Gibco 10270) and 1% antibiotic/antimycotic (100U/mL penicillin and 10 $\mu\text{g}$ /mL streptomycin, Sigma P0781). Cells were maintained in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 37°C and the medium was changed at 48 to 72 hours intervals.

### 2.4. Uptake Studies

Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), then harvested with a solution of 0.25% trypsin/EDTA (Gibco 25200) and finally resuspended in medium at  $2 \times 10^6$  cells/mL in 25cm<sup>2</sup> flasks. After 1 hour,  $^{99m}\text{Tc-AA}$  was introduced in the medium (0.925MBq/mL). Triplicate samples of 200 $\mu\text{l}$  were collected to eppendorf tubes containing chilled PBS to determination of tracer uptake at 5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes. During tracer uptake studies, for every sample taken, the cells were resuspended in order to ensure uniformity. Cell suspensions were then centrifuged at 10000rpm for 1 minute, followed by aspiration of the supernatant. Radioactivity of cell pellets and supernatants was measured separately with a well-type gamma counter (DPC Gamma C12) to determine tracer's uptake percentage in the cells. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion test at the end of the experiment.

### 2.5. Biodistribution Studies in Normal Mice

For biodistribution studies in normal models, we used 6-8 weeks old *Balb/c* mice with a weight in the range of 21-29g. The mice were subcutaneously anesthetized with a solution of ketamine 77% (KetalarR, Parke-Davis) and chlorpromazine 23% (Largactil, Victoria Laboratories) and subsequently the  $^{99m}\text{Tc-AA}$  was injected intravenously into the dorsal vein of the tail. After radiotracer administration, the mice were sacrificed by cervical dislocation at different times (30, 60, 120, 180 and 360 minutes) in accordance with existing ethical legislation in Faculty of Medicine, University of Coimbra. At these times, several organs, tissues and excretion fluids were harvested. Every organ, tissue or fluid, after being weighed, was placed in a radioimmunoassay (RIA) tube and counted on well-type gamma counter (DPC Gamma C12), thus obtaining the percentage of radiotracer administered for each gram of organ/ tissue/ fluid collected (% injected dose/gram). The same procedure was followed in two *Balb/c nu/nu* mice to check if the values

**Table 1. Retention Times of Standard Samples and the  $^{99m}\text{Tc-AA}$ . The Values for Standard Samples Represent the Average of Three Injections into the HPLC, While the Value for  $^{99m}\text{Tc-AA}$  Results from the Average of four Randomly Selected Pharmaceutical Formulations**

Compound	Retention Time (Minutes)	Type of Detection
Iron (III) chloride	$2.75 \pm 0.01$	Ultraviolet
Ascorbic acid	$3.85 \pm 0.03$	Ultraviolet
Sodium pertechnetate	$4.36 \pm 0.03$	Radioactivity
$^{99m}\text{Tc-AA}$	$3.05 \pm 0.12$	Radioactivity

differ or not between animals with and without immune system.

## 2.6. Biodistribution Studies in Xenotransplanted Mice

To perform the biodistribution studies in athymic Balb/c nu/nu mice,  $8 \times 10^6$  WiDr cells were previously inoculated in the dug right axillary of mice. We adopted the same protocol as the studies with normal mice. However, apart from the organs/ tissues/ fluids harvested, each tumor was excised, weighed, counted in well counter and calculated its volume through the equation  $V = (L \times S^2)/2$  [27]. In this equation, L corresponds to the greater diameter of the tumor and S to the smallest diameter.

## 2.7. Statistical Analysis

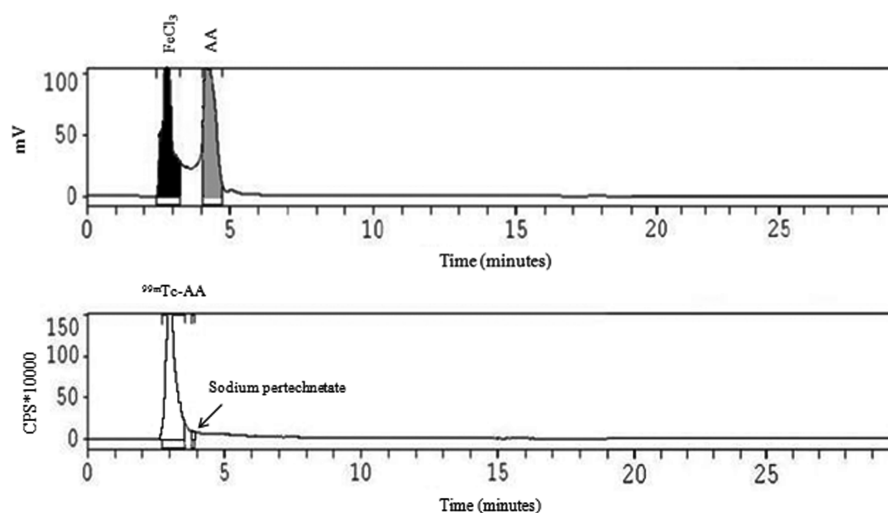
Results were analyzed using the SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), version 16, at a significance level of 5%. In all studies, we used nonparametric tests because the data samples are small and do not follow a normal distribution. In cases in which it was intended to make the comparison of paired values we used the Wilcoxon test. The Mann-Whitney test was used to compare two independent samples within the same variable and, to compare the results of three or more related samples, it was used the bivariate variance test of Friedman.

## 3. RESULTS

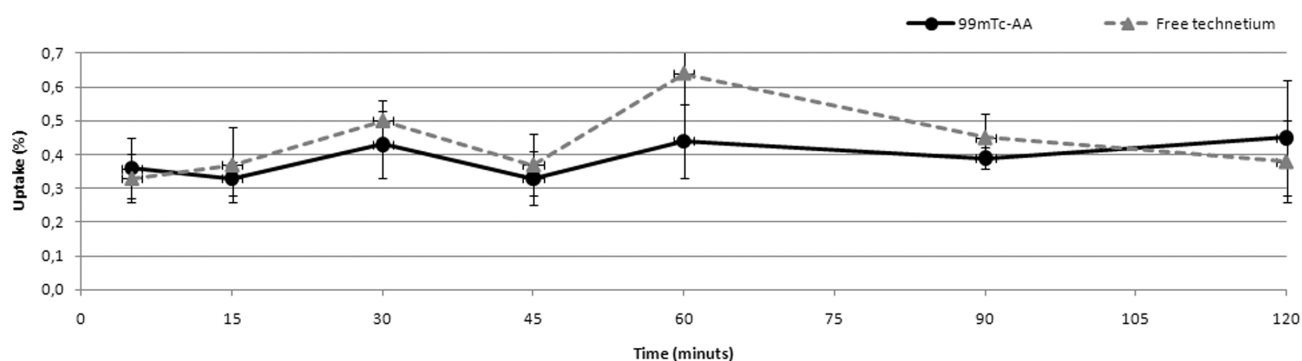
### 3.1. Radiolabelling of Ascorbic Acid and Quality Control of $^{99m}\text{Tc-AA}$

After the radiolabelling procedure of AA, the radiochemical purity of the complex was analyzed by HPLC. We proceeded to a detection of non-radioactive (AA and iron III chloride) and radioactive components (sodium pertechnetate). The chromatograms of standard samples allow us, through comparison with the radiotracer chromatogram, to identify all the components present in the radiotracer formulation. Through these chromatograms it was obtained the retention times of each of the standard samples, as well as the retention time of  $^{99m}\text{Tc-AA}$ , as can be observed in Table 1.

By graphical integration and normalization of peak areas of  $^{99m}\text{Tc-AA}$  and sodium pertechnetate, we can directly obtain the value of labeling efficiency. Fig. (2) represents the chromatograms of the non radioactive and radioactive compounds of a pharmaceutical formulation with high labeling efficiency (99.03%). By analyzing the formulation over time, we can verify that the labelling efficiency remained high (always above 95%) and approximately constant over time (6 hours of the time course), revealing the high stability of the formulation.



**Fig. (2).** Chromatograms of a formulation with a high labeling efficiency of 99,03%. Chromatogram of non-radioactive (top) and radioactive compounds (below).



**Fig. (3).** Uptake of <sup>99m</sup>Tc-AA and sodium pertechnetate by WiDr cells over time. WiDr cells were incubated with 0.925MBq/mL, hereafter the percentage of uptake of the radiotracer formulation by influx studies was determined. The results express the mean of six independent experiments ± standard deviation.

### 3.2. Uptake Studies

From the results shown in Fig. (3), the percentage of uptake of <sup>99m</sup>Tc-AA in WiDr cells is lower than the uptake of sodium pertechnetate over time. <sup>99m</sup>Tc-AA has the same profile curve of sodium pertechnetate and the uptake peak occurs up to 120 minutes with a highest value of 0,45%, while 0,64% of sodium pertechnetate is taken up at 60 minutes. As shown in the Fig. (3), the values of uptake of <sup>99m</sup>Tc-AA did not differ significantly from the values obtained for sodium pertechnetate, and the uptake of <sup>99m</sup>Tc-AA by WiDr cells always presents itself with very low values in the range of 0.36% to 0.45%. Through statistical analysis it was found that there are no significant differences over time in WiDr. The trypan blue exclusion assay revealed that more than 95% of the cells were alive at the conclusion of all experiments (data not shown).

### 3.3. Biodistribution Studies in Normal Mice

In order to study the excretion pathways of the radiotracer developed and confirm the results obtained in quality control studies, biodistribution in *Balb/c* and *Balb/c nu/nu*

mice were performed. The biodistribution in normal mice (*Balb/c*) is essential for estimating any differences in the mice with xenografts (*Balb/c nu/nu*). Table 2 shows the biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-AA in *Balb/c* mice and the quantification of administered dose per gram of organ. The results show that <sup>99m</sup>Tc-AA is excreted by urinary and hepatic tract. There was no uptake of <sup>99m</sup>Tc-AA by any specific organ.

We conducted a biodistribution study in two *Balb/c nu/nu* normal mice (with a mass equal to 16 and 21) sacrificed after 30 minutes after tracer administration. The results of this study show that hepatic tract excretion is in the same order of magnitude recorded for hepatic excretion in *Balb/c* mice at the same time. However, excretion by urinary tract is about 3 to 5 times greater than that recorded for *Balb/c* mice. An increased uptake of <sup>99m</sup>Tc-AA in most organs in athymic mice was registered (data not shown).

### 3.4. Biodistribution Studies in Xenotransplanted Mice

For biodistribution studies in xenotransplanted animals, we used *Balb/c nu/nu* mice, since these animals are athymic and therefore they have no immune system. For this reason,

**Table 2.** Biodistribution in *Balb/c* Mice After 30, 60, 120, 180 and 360 Minutes of Tracer Administration Expressed as the Percentage of Injected Dose Per Gram of Tissue/ Fluid. The Urine is Expressed as a Percentage of Total Injected Dose. The Results Represent the Average of Four Mice Per Time. SD = Standard Deviation

	30 Minutes		60 Minutes		120 Minutes		180 Minutes		360 Minutes	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Urine	27,5201	7,27	31,1812	4,11	39,0412	9,32	24,8213	7,75	20,1150	5,69
Blood	3,3046	3,39	2,1804	1,68	1,0643	0,32	2,0184	1,82	1,3795	1,26
Liver	1,8336	1,17	2,1149	0,89	2,7071	0,68	1,7452	1,28	1,3612	0,75
Spleen	0,4859	0,28	0,4714	0,41	0,3420	0,07	0,4837	0,49	0,7467	0,25
Heart	0,6140	0,28	0,5875	0,36	0,3209	0,09	0,3898	0,29	0,1777	0,11
Genital	0,8081	0,66	1,3285	1,47	1,0549	0,45	0,9612	1,29	0,4853	0,35
Thyroid	0,5844	0,15	0,7180	0,30	0,5057	0,10	0,8649	0,74	0,5185	0,15
Stomach	1,1783	0,64	1,0073	0,61	0,7412	0,14	0,9960	0,74	0,6582	0,31
Kidney	4,1172	2,17	4,9472	2,42	5,4208	1,32	8,2803	4,33	4,0748	2,17

**Table 3.** Biodistribution of Radiotracer in *Balb/c nu/nu* Mice with Xenografts. After 30, 60, 120, 180 and 360 Minutes of Tracer Administration, the Mice were Sacrificed, the Organs Harvested and the Percentage of Injected Dose Per Gram of Tissue was Evaluated. The Urine is Expressed as a Percentage of Total Injected Dose. The Results Represent the Average of Four Mice Per Time. SD - Standard Deviation

	30 Minutes		60 Minutes		120 Minutes		180 Minutes		360 Minutes	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Urine	14,4799	0,44	8,8535	1,77	10,4886	5,07	11,5213	4,80	18,02	3,10
Blood	4,2491	2,30	3,1594	1,83	1,5795	1,17	2,2162	1,62	0,4582	0,12
Liver	1,6253	1,25	2,1634	1,48	1,7226	1,16	1,7327	0,68	0,7782	0,27
Spleen	1,0211	0,85	1,1903	0,77	0,9459	1,24	0,4134	0,28	0,1761	0,10
Heart	1,2956	0,98	1,1343	0,65	0,5725	0,42	0,4908	0,45	0,1626	0,06
Genital	1,7179	0,68	2,0233	0,76	1,2956	1,93	1,4630	3,25	1,0410	0,16
Thyroid	1,1547	1,29	1,2149	1,21	2,4269	0,61	3,2253	0,42	0,2760	0,55
Stomach	1,1700	0,74	1,1944	0,71	0,9205	0,65	0,8772	0,47	0,4272	0,16
Kidney	13,1201	13,43	10,7047	6,92	7,2494	4,81	8,0937	4,47	4,0803	1,30
Tumor	0,8970	0,86	1,0624	0,72	0,6931	0,75	0,8626	0,52	0,1238	0,06

they become ideal models for studying the uptake *in vivo* of  $^{99m}\text{Tc}$ -AA by tumor cells. The result of the biodistribution study in *Balb/c nu/nu* xenografts reveals excretion by urine and hepatic tract, with no preferential uptake by any other organ (Table 3). The percentage of injected dose per gram of tumor tissue was always less than approximately 1% over time. In Table 2 and 3 we can see that thyroid, stomach, liver and spleen have a lower uptake.

#### 4. DISCUSSION/CONCLUSION

Vitamin C is a nutrient whose benefits are long-known and widely disseminated, being the majority due to the antioxidant action of this vitamin. However, some studies suggest that this nutrient may have a preventive and therapeutic role in cancer disease due to its potential pro-oxidant activity, promoting the formation of ROS that induce selectively cell death in cancer cells [28]. Due to debate that continues in the scientific community about benefits/harms of large doses of vitamin C in preventing and treating cancer, it becomes imperative to undertake more studies to infer about the true function of this antioxidant/ pro-oxidant in health and human disease. Therefore, this study intends to obtain the radiotracer  $^{99m}\text{Tc}$ -AA and to evaluate the biodistribution and excretion pathways of vitamin C by nuclear medicine techniques, seeking to achieve results that represent an asset for the evaluation of the applicability of vitamin C on cancer.

In order to explore the possibilities presented by nuclear medicine and applying them to the study of functional and metabolic processes of vitamin C, this nutrient was labelled with a single photon emitting radionuclide ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Radiolabelling of AA was already done with other radionuclides ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ) but, in respect to technetium, there are few studies described [29]. After several attempts to optimize the process of radiolabelling of the reduced form of vitamin C,

the labelling efficiency reached its maximum using 200mg of AA with 222MBq pertechnetate in 1,5mL of sodium chloride 0,9%, 0,2mL of iron chloride III 0,1N (in 0,1N of hydrochloric acid) and pH 6,5-7,0. When the radiolabelling process was performed at room temperature in argon atmosphere and protected from light, the labelling efficiency was considerably higher, as shown in Fig. (2). This can be explained because AA is highly unstable and degrades in the presence of oxygen and light. Moreover, it is known that as the temperature increases, the degradation of AA tends to increase [30]. After several enhancements, we concluded that the pharmaceutical formulation developed at room temperature (21-23°C) was quite stable over time.

The HPLC was used to determine the radiochemical purity of the complex and determine the optimal conditions for obtaining a high labelling efficiency. The reverse phase HPLC allows to separate the compounds present in a sample according to their interaction with a non-polar stationary phase. This type of chromatography was chosen because vitamin C is a polar molecule that interacts with the stationary phase and that will have more affinity for the mobile phase.

The retention times of the individual constituents gave the possibility, by comparison, to know what is the retention time of  $^{99m}\text{Tc}$ -AA and also to infer the polarity of molecules that constitute the formulation developed. Thus, the sodium pertechnetate is less polar because it has the highest retention time, while the iron (III) chloride is the most polar because it is quickly dragged by mobile phase system. The labelling efficiency obtained over 6 hours at 0, 30, 60, 180, 240 and 360 minutes remained consistently above 95% and relatively constant over time, revealing the high stability of the formulation developed. On the other hand, since accumulation of sodium pertechnetate occurs at the level of thyroid and stomach and the accumulation of reduced and hydrolyzed

technetium occurs in the liver and spleen, it confirms through *in vivo* studies that radiochemical impurities in the formulation developed are residual in the formulation developed. Note that it is not possible to observe the peak of the reduced and hydrolyzed technetium because it is retained in the pre-column.

After obtaining a stable pharmaceutical formulation with high radiochemical purity, we proceeded with *in vitro* studies to assess the kinetics of intake of vitamin C in colorectal adenocarcinoma cells (WiDr). From the results, we conclude that there are no significant uptake of the tracer by the cells. Indeed, uptake by WiDr cells did not exceed 0.45%, being the uptake of  $^{99m}\text{Tc-AA}$  similar to the uptake of sodium pertechnetate. Once the cell viability was determined after the end of the study using the technique of trypan blue, ensures that the results are not due to cell death.

In order to investigate the routes of excretion and metabolism of the labeled compound, as well as to confirm the results of the quality control, we performed biodistribution studies in *Balb/c* and *Balb/c nu/nu* mice. The biodistribution in *Balb/c* mice verified that the excretion of the complex was realized by urine and liver. These results are in agreement with those reported by Yigit [29], who performed biodistribution studies in male albino *Wistar* rats after radiolabel AA with  $^{99m}\text{Tc}$  through a different protocol. The same results were obtained in *Balb/c nu/nu* xenografts. Interestingly, the uptake of  $^{99m}\text{Tc-AA}$  in almost all organs in *Balb/c nu/nu* was higher than for *Balb/c*, which immediately raised suspicions if the biodistribution in athymic and normal mice were different. To prove this, we performed biodistribution studies in two *Balb/c nu/nu* healthy mice and found that the uptake in some organs was 3 to 5 times higher than that obtained in *Balb/c* mice. Animals containing the enzyme *Gulo*, and therefore produce vitamin C, have less need for vitamin C as nutrient while are not as "efficient" in the production of this nutrient and, therefore, captures more vitamin C to suit their needs. Moreover, athymic mice do not have an active immune system and vitamin C fulfils several functions at this level. So, the capture of the complex may be greater in these mice due to the attempt to incorporate the vitamin C in some metabolic processes related to immunity. Lastly, a low tumor uptake of the radioactive complex was recorded.

We believe that our results are consistent with data obtained by other authors, who claim that tumor cells are not capable of carrying the AA directly because they have no sodium-dependent vitamin C transporters (SVCT), the proteins that directly transport AA into the cell [31]. In the transport mediated by SVCT, occurs the temporary combination of substances to be transported (AA and sodium ions) and enzyme systems, called by ATPases, with the transport being done with energy expenditure derived from the metabolism. Thus, SVCT carry the AA at the expense of an electrochemical gradient of sodium across the cell membrane and, therefore, this transport is classified as a secondary active transport. Tumor cells have a high expression of glucose transporters (GLUT), also responsible for transporting the oxidized form of vitamin C inside the cell. DHA passes through the cell membrane by a transport mechanism

in the same direction of the gradient, taking the assistance of specific transporters that appear to have no affinity for the biologically active and reduced form of vitamin C, the GLUT's. This mechanism is used indirectly by the cell to carry the AA for its interior through three steps: 1) oxidation of extracellular AA transforming it into DHA; 2) transport of DHA by the transporter GLUT; 3) intracellular reduction of DHA to AA, thus preventing the efflux of oxidized form [32, 33]. Taking into account our results, we believe that tumor cells (*in vitro* and *in vivo*) are not capable of capturing the  $^{99m}\text{Tc-AA}$  because AA is chemically bound to technetium, preventing the subsequent uptake by tumor cells. Thus, the analysis of the developed formulation from the standpoint of molecular structure can be crucial to confirm and better understand our results.

## REFERENCES

- [1] Lee, KW.; Lee, HJ.; Surh, YJ.; Lee, CY. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2003**, 78(6), 1074-1078.
- [2] Padayatty, SJ.; Levine, M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*, **2001**, 164(3), 353-355.
- [3] Li, Y.; Schellhorn, HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.*, **2007**, 137(10), 2171-2184.
- [4] Cameron, E.; Campbell, A. The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem. Biol. Interact.*, **1974**, 9(4), 285-315.
- [5] Padayatty, SJ.; Levine, M. Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2000**, 19(4), 423-425.
- [6] Padayatty, SJ.; Riordan, HD.; Hewitt, SM.; Katz, A.; Hoffer, LJ.; Levine, M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*, **2006**, 174(7), 937-942.
- [7] Padayatty, SJ.; Sun, H.; Wang, Y. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann. Intern. Med.*, **2004**, 140(7), 533-537.
- [8] Chen, Q.; Espey, MG.; Krishna, MC. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102(38), 13604-13609.
- [9] Gonzalez, MJ.; Miranda-Massari, JR.; Mora, EM. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integr. Cancer Ther.*, **2005**, 4(1), 32-44.
- [10] Levine, M.; Espey, MG.; Chen, Q. Losing and finding a way at C: new promise for pharmacologic ascorbate in cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.*, **2009**, 47(1), 27-29.
- [11] Verrax, J.; Calderon, PB. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 76(12), 1644-1652.
- [12] Heaney, ML.; Gardner, JR.; Karasavvas, N. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res.*, **2008**, 68(19), 8031-8038.
- [13] Levine, M.; Rumsey, SC.; Daruwala, R.; Park, JB.; Wang, Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA*, **1999**, 281(15), 1415-1423.
- [14] Rivas, CI.; Zuniga, FA.; Salas-Burgos, A.; Mardones, L.; Ormazabal, V.; Vera, JC. Vitamin C transporters. *J. Physiol. Biochem.*, Dec **2008**, 64(4), 357-375.
- [15] Rock, CL.; Jacob, RA.; Bowen, PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J. Am. Diet Assoc.*, **1996**, 96(7), 693-702.
- [16] Agus, DB.; Vera, J.; Golde, DW. Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. *Cancer Res.*, **1999**, 59(18), 4555-4558.
- [17] Riordan, NH.; Riordan, HD.; Meng, X.; Li, Y.; Jackson, JA. Intravenous ascorbate as a tumor cytotoxic chemotherapeutic agent. *Med. Hypotheses*, **1995**, 44(3), 207-213.



- [18] Drisko, JA.; Chapman, J.; Hunter, VJ. The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2003**, *22*(2), 118-123.
- [19] Agus, DB.; Gambhir, SS.; Pardridge, WM. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.*, **1997**, *100*(11), 2842-2848.
- [20] Fiorani, M.; De Sanctis, R.; Scarlatti, F. Dehydroascorbic acid irreversibly inhibits hexokinase activity. *Mol. Cell. Biochem.*, **2000**, *209*(1-2), 145-153.
- [21] Tsukaguchi, H.; Tokui, T.; Mackenzie, B. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, **1999**, *399*(6731), 70-75.
- [22] Wright, JR.; Castranova, V.; Colby, HD.; Miles, PR. Ascorbate uptake by isolated rat lung cells. *J. Appl. Physiol.*, **1981**, *51*(6), 1477-1483.
- [23] Baker, EM.; Hodges, RE.; Hood, J.; Sauberlich, HE.; March, SC. Metabolism of ascorbic-1-<sup>14</sup>C acid in experimental human scurvy. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1969**, *22*(5), 549-558.
- [24] Wu, HC.; Lu, HF.; Hung, CF.; Chung, JG. Inhibition by vitamin C of DNA adduct formation and arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumor cells. *Urol. Res.*, **2000**, *28*(4), 235-240.
- [25] Tolbert, BM.; Chen, AW.; Bell, EM.; Baker, EM. Metabolism of l-ascorbic-4-3H acid in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1967**, *20*(3), 250-252.
- [26] Hornig, D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1975**, *258*, 103-118.
- [27] Dagrosa, M.; Viaggi, M.; Longhino, J.; Calzetta, O.; Cabrini, R.; Edreira, M.; Juvenal, G.; Pisarev, M. Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **2003**, *57*, 1084-1092.
- [28] Carr, A.; Frei, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.*, **1999**, *13*, 1007-1024.
- [29] Yigit, S. Preparation of <sup>99m</sup>Tc labeled vitamin C (ascorbic acid) and biodistribution in rats. *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, *54*.
- [30] Nováková, L.; Solich, P.; Solichová, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends Ana. Chem.*, **2008**, *27*, 942-958.
- [31] Agus, B. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.*, **1999**, *100*.
- [32] Li, Y.; Schellhorn, H. New developments and novel therapeutic perspectives for Vitamin C. *J. Nutrition*, **2007**, *137*, 2171-2179.
- [33] Wilson, J. Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.*, **2005**, *25*, 105-125.

