

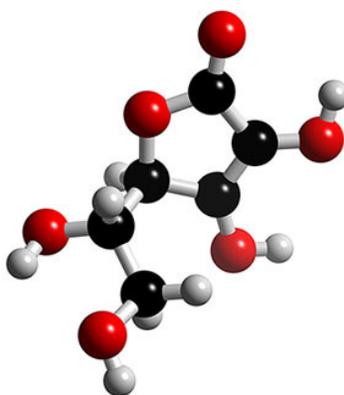
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade de Coimbra

Departamento de Física



Citotoxicidade da vitamina C em células tumorais



Estudos in-vitro e in-vivo através de métodos
bioquímicos e de imagiologia nuclear

Trabalho realizado por: Ana Salomé dos Santos Pires

Trabalho orientado por: Prof^a Doutora Maria Filomena Botelho

Trabalho co-orientado por: Prof^a Doutora Ana Bela Sarmiento e Doutor Paulo Crespo

Coimbra, Julho de 2008

Agradecimientos

Muitos foram aqueles que de forma directa ou indirecta, no palco ou nos bastidores, contribuíram para o findar desta etapa da minha vida académica, marcado por este projecto.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, orientadora deste projecto, pela sua dedicação, disponibilidade e apoio, pelo seu contagiante sentido de organização e por todo o partilhar de conhecimento.

Ao Doutor Paulo Crespo agradeço por ter estado na origem deste projecto tão aliciante e pelas suas palavras de apoio sempre com um toque de motivação.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmento agradeço pela co-orientação, apoio na análise de resultados e na elaboração desta dissertação.

À Margarida Abrantes, um exemplo de trabalho e dedicação, que me ensinou quase tudo o que aprendi durante este último ano, o meu sincero obrigado por todas as horas dispendidas, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade e apoio que me ajudaram a ultrapassar cada etapa de forma mais leve.

À Mafalda Laranjo pela cooperação nas mais variadas tarefas, à professora Elisa Serra pela ajuda fornecida aquando da marcação da vitamina C, à Professora Bárbara Oliveira pela disponibilidade em me ajudar na análise estatística dos resultados, à Cristina Gonçalves pelo tempo dispendido para que os experimentos de citometria fossem concretizados, aos estagiários de Medicina Nuclear da ESTS do Porto pela ajuda que me deram ao longo do ano, à Cláudia Caridade pelo apoio em pequenos mas valiosos gestos diários e aos restantes elementos do serviço da biofísica que de alguma forma terão contribuído para este trabalho.

Agradeço aqueles que diariamente me acompanharam e tornaram os dias no IBILI agradáveis, repletos de boa disposição e de contínuos gestos de amizade, Sara, João, Mónica, Ana Pratas e Luís.

À Daniela Roque, Daniela Gaspar, Diana e Elsa, minhas colegas de casa, pelo apoio e preocupação diariamente demonstrados e pelo bem-estar caseiro proporcionado no findar de cada dia.

Aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram, obrigado pelo carinho e preocupação continuamente demonstrados.

Ao Tiago, meu namorado, a quem não tenho palavras para agradecer a presença e apoio constantes, ajuda e paciência, e o transformar de cada pedra de tropeço num degrau que permitisse subi-la e ultrapassá-la.

E por último, mas no topo de importância, agradeço a Deus pela contínua presença, por ter colocado no meu caminho todas estas pessoas, assim como, muitas outras não mencionadas, e pelo incessante amparo na concretização deste projecto.

Resumo

A vitamina C é uma substância essencial no metabolismo das células vivas, com inúmeras propriedades fisiológicas, apresentando-se maioritariamente sob duas formas, a reduzida e a oxidada. O ácido ascórbico (AA), a forma reduzida da vitamina C, é um potente antioxidante hidrossolúvel, na medida em que neutraliza os radicais livres, constituindo um potencial mecanismo anticancerígeno. A vitamina C actua também como pró-oxidante, promovendo a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que comprometem a viabilidade celular. Por outro lado, a maioria das células tumorais não transporta directamente o AA para o seu interior, razão pela qual as células obtêm a vitamina C na sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA). As células tumorais demonstram ainda outra particularidade, a diminuição da catalase (enzima responsável pela destoxificação do H_2O_2), num factor entre 10 e 100, relativamente às células normais. Assim, o aumento da produção de H_2O_2 , acoplado à deficiência da actividade da catalase nas células neoplásicas e à presença de metais de transição, poderá redundar na citotoxicidade selectiva da vitamina C e na conseqüente revelação do seu potencial terapêutico.

O objectivo deste trabalho é avaliar o metabolismo das duas formas da vitamina C e mostrar o efeito citotóxico das mesmas, em células de adenocarcinoma do cólon, recorrendo a métodos bioquímicos e de imagiologia nuclear.

Primeiramente, efectuou-se a marcação da forma reduzida da vitamina C com tecnécio, de forma a obter um complexo radioactivo ($^{99m}Tc-AA$) passível de ser usado em imagiologia nuclear.

Posteriormente, realizaram-se estudos *in vitro*, com a linha celular de adenocarcinoma do cólon (WiDr), que incluíram estudos de captação com $^{99m}Tc-AA$,

estudos de estabilidade por HPLC e estudos de avaliação da citotoxicidade da vitamina C. Estes incluíram a análise do seu efeito na proliferação, na viabilidade e na morte das células WiDr, recorrendo a técnicas de colorimetria e à citometria de fluxo.

Por último, foram feitos estudos *in vivo*, com ratinhos Balb/c nu/nu, com o intuito de comprovar os resultados obtidos no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$, e obter informação sobre a biodistribuição e vias de excreção e metabolização do mesmo.

Assim, foi desenvolvido um procedimento adequado de marcação radioactiva, assim como, um método de controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$, por HPLC, permitindo atingir uma elevada eficiência de marcação. Os resultados obtidos dos estudos *in vitro* revelaram que ambas as formas da vitamina C induzem um efeito anti-proliferativo e citotóxico nas células de adenocarcinoma do cólon, embora em diferentes concentrações e tempos de exposição, podendo eventualmente constituir uma nova abordagem terapêutica no tratamento do cancro do cólon. Os estudos *in vivo* comprovaram o elevado grau de pureza radioquímica do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$.

Lista de Abreviaturas

AA – Ácido Ascórbico

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ATP – Trifosfato de Adenosina

Bq – Becquerel (uma desintegração por segundo - unidade do sistema internacional)

CAT – Catalase

CPM – Contagens por Minuto

CPS – Contagens por Segundo

Da – Dalton

DCF – 2,7 Dichlorofluorescein

DHA – Ácido Dehidroascórbico

DHE – Dihidroetídeo

DMEM – *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*

g – Unidade de força centrífuga relativa

GLUT – Transportadores de Glicose

GPx – Peroxidase do Glutatião

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

IP – Iodeto de Propídeo

JC-1 – *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*

K_m – Constante de *Michaelis*

LEHR – *Low Energy High Resolution*

MTT – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]

p.a. – *pro analysis*

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

RIA - Radioimunoensaio

R_f – *Retention Factor*

RNS – *Reactive Nitrogen Species*

ROI – *Region of interest*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SO – *Stresse Oxidativo*

SOD – *Superoxide Dismutase*

SVCT – *Sodium Vitamin C Cotransporters*

UV - *Ultravioleta*

V – *Volte*

Índice

Agradecimentos	III
Resumo.....	VII
Lista de Abreviaturas.....	XI
Índice.....	XV
Capítulo I	1
1. Introdução.....	1
1.1. Funções	4
1.2. Metabolismo	5
1.2.1. Absorção, Armazenamento e Excreção	5
1.2.2. Transporte.....	6
1.2.2.1. Transporte indirecto via GLUTs.....	8
1.2.2.2. Transporte directo via SVCTs	9
1.3. Vitamina C & Cancro	13
1.3.1. Administração i.v. vs. oral	17
1.3.2. Stresse Oxidativo.....	19
1.3.2.1. Efeito antioxidante	22
1.3.2.2. Efeito pró-oxidante	24
1.3.3. Citotoxicidade selectiva.....	25
Capítulo II	29
2. Métodos	29
2.1. Estudos de Química	32
2.1.1. Preparação do ^{99m} Tc-AA	32
2.1.2. Controlo de Qualidade de ^{99m} Tc-AA	33
2.1.2.1. HPLC	34
2.1.2.2. Microcromatografia ascendente.....	38
2.2. Estudos in vitro.....	41
2.2.1. Culturas celulares de adenocarcinoma do cólon	42

2.2.2.	Estudos de Captação	42
2.2.3.	Determinação da Viabilidade e Celular	44
2.2.4.	Estudos de estabilidade da vitamina C.....	45
2.2.4.1.	Avaliação do meio extracelular	46
2.2.5.	Determinação da citotoxicidade da vitamina C	47
2.2.5.1.	Avaliação da proliferação celular por colorimetria	48
2.2.5.2.	Avaliação da viabilidade, morte celular e produção de ROS por citometria de fluxo	49
2.2.5.2.1.	Avaliação da morte celular.....	49
2.2.5.2.2.	Avaliação da presença de peróxidos.....	50
2.2.5.2.3.	Avaliação da produção de O ₂ [*]	52
2.2.5.2.4.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	53
2.3.	Estudos <i>in vivo</i>	54
2.3.1.	Estudos de Biodistribuição com ^{99m} Tc-AA	54
2.3.2.	Imagiologia com ^{99m} Tc-AA	55
2.4.	Análise Estatística.....	57
Capítulo III	59
3.	Resultados.....	59
3.1.	Estudos de química	61
3.1.1.	Preparação e controlo de qualidade do ^{99m} Tc-AA.....	61
3.1.1.1.	HPLC	61
3.1.1.2.	Microcromatografia ascendente.....	65
3.2.	Estudos <i>in vitro</i>	66
3.2.1.	Estudos de captação do ^{99m} Tc-AA.....	66
3.2.2.	Estudos de estabilidade da vitamina C.....	68
3.2.2.1.	Avaliação do meio extracelular	71
3.2.3.	Determinação da citotoxicidade da vitamina C	76
3.2.3.1.	Avaliação da proliferação celular	76

3.2.3.2.	Avaliação da viabilidade e morte celular	78
3.2.3.3.	Avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade da vitamina C....	80
3.2.3.4.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	83
3.3.	Estudos <i>in vivo</i>	84
Capítulo IV	89
4.	Discussão.....	89
Conclusão	101
Bibliografia	107

Capítulo I

Introdução

O ácido ascórbico (AA), também denominado vitamina C ou ascorbato, é uma lactona ($C_6H_{12}O_6$) cujo peso molecular é 176,13 Da. Foi isolado pela primeira vez em 1928, pelo bioquímico e Prémio Nobel *Szent-Gyorgyi*. No seu estado natural, a vitamina C aparece na forma de cristal ou pó, e pode apresentar uma tonalidade desde o branco ao amarelo. O AA é uma vitamina hidrossolúvel e encontra-se nos frutos, principalmente os pertencentes à família dos citrinos, tais como laranjas, limões, limas e tangerinas, sendo todavia também abundante nos vegetais verdes foliformes. O AA é um antioxidante instável, facilmente oxidável e cujas ligações podem ser quebradas pelo oxigénio, por bases alcalinas e temperaturas elevadas. Deste modo, existem duas formas: a forma reduzida e a forma oxidada. As estruturas moleculares do AA e da sua forma oxidada, ácido dehidroascórbico (DHA – *dehydroascorbic acid*), são semelhantes à da glicose devido à existência de vários grupos hidroxilo (OH) próximos uns dos outros (Figura 1). A enzima que medeia a reacção de oxidação que origina o DHA a partir do AA é a reductase (Agus, et al., 1999; González, et al., 2005; Wilson, 2005; Iqbal, et al., 2004).

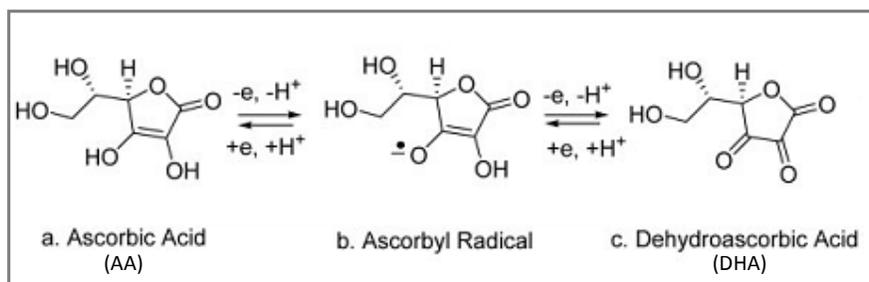


Figura 1 - Reacção de oxidação do AA com formação de DHA. Retirado de (Corpe, et al., 2004).

1.1. Funções

O ser humano é incapaz de sintetizar a vitamina C, tendo por isso de a obter a partir da ingestão exógena, sendo necessária, em pequenas concentrações, para o cumprimento das funções fisiológicas normais. Uma das funções básicas e conhecidas do AA é o facto de este ser um dador de electrões, função que se destaca no seu envolvimento na aceleração de reacções de hidroxilação (nomeadamente, do colagénio), na regulação do sistema nervoso através da biossíntese da carnitina, da dopamina, da noradrenalina e da adrenalina, no metabolismo da tirosina, do ácido fólico e triptofano, assim como, na amidação de hormonas peptídicas. Em muitas destas reacções, o AA fornece electrões a enzimas que necessitam de iões metálicos prostéticos para atingirem actividade enzimática máxima. Assim, o ascorbato tem também um papel de elevada relevância no crescimento de tecidos e processos de cicatrização de feridas, na formação de neurotransmissores e no aumento da absorção de ferro ao nível dos intestinos. Como antioxidante, protege as células dos efeitos nefastos dos radicais livres, apesar do papel antioxidante da vitamina C ainda não ser conhecido na sua totalidade. Este último aspecto será com maior pormenor desenvolvido posteriormente (Padayatty, et al., 2001; González, et al., 2005; Wilson, 2005; Iqbal, et al., 2004).

Doses elevadas de vitamina C são usadas no tratamento e prevenção de um vasto número de doenças, tais como diabetes, cataratas, glaucoma, degeneração macular, arteriosclerose, derrame cerebral, doenças cardíacas e cancro. Por outro lado, a deficiência em vitamina C resulta na subhidroxilação do colagénio necessário para o tecido conjuntivo, nomeadamente dos ossos e dentina (constituente maioritário

dos dentes). Outras consequências da carência de vitamina C são anemia, escorbuto, fraqueza, depressão, retenção de fluidos, hemorragia ao nível das gengivas, degeneração muscular, cicatrização lenta de feridas aumentando a susceptibilidade às infecções, hemorragias capilares e distúrbios nervosos (Iqbal, et al., 2004).

1.2. Metabolismo

1.2.1. Absorção, Armazenamento e Excreção

Os humanos apenas obtêm a vitamina C exogenamente, cuja absorção ocorre na mucosa bucal, estômago e intestino delgado. A ingestão do AA ou da sua forma oxidada, DHA, aumenta a concentração plasmática de ascorbato (a forma predominante da vitamina C a pH fisiológico) em indivíduos normais. A administração de 1 a 1,5 g resulta numa absorção de 50 % enquanto, uma taxa de absorção de 98 % é atingida com uma administração inferior a 20 mg, isto é, a taxa de absorção intestinal diminui à medida que aumenta a dose de AA administrada. Após a absorção pelas células epiteliais do intestino delgado, a vitamina C é difundida para os capilares circundantes e posteriormente para o sistema circulatório. No rim, o AA é filtrado pelos capilares glomerulares para a cápsula de *Bowman* pelo mecanismo normal de filtração glomerular. Ao passar pelo túbulo contornado proximal, o AA é reabsorvido para os capilares circundantes através das células epiteliais renais por transportadores activos específicos. Assim, a diferença entre a quantidade de AA filtrado e reabsorvido constitui a excreção renal. Desta forma, a absorção intestinal e a excreção renal determinam a biodisponibilidade de vitamina C, ou seja, a concentração intracelular

máxima efectiva da vitamina C (Wilson, 2005; Iqbal, et al., 2004; Helwig; Li, et al., 2007).

A vitamina C é armazenada pelos tecidos e sangue, e está presente nos tecidos em concentrações 3 a 10 vezes superiores às do plasma, devido à acção de sistemas (“bombas”) de transporte activo. A quantidade total de vitamina C no corpo humano estima-se em 20 mg/Kg, o que corresponde a uma concentração plasmática de 57 μ M. Encontra-se em maiores concentrações nas glândulas pituitárias e adrenais e no cristalino, ao contrário da saliva e plasma onde se encontra em menores concentrações. Está também presente em níveis intermédios noutros tecidos, tais como, rins, cérebro, fígado, pulmões e tiróide. Por outro lado, as suas propriedades hidrossolúveis determinam que a eliminação da vitamina C seja essencialmente renal, não permitindo o seu armazenamento no tecido adiposo. De salientar que os rins desempenham o papel de maior relevância tanto na excreção como na retenção da vitamina C, na medida em que, regulam a sua concentração tecidular. Se o nível basal for inferior ou igual a 1500 mg, o AA e o DHA podem ser reabsorvidos pelos túbulos renais. Neste caso, não ocorrerá excreção urinária da vitamina C. Contudo, para níveis entre 1500 e 3000 mg verificar-se-á a saturação dos tecidos e conseqüentemente a excreção através da urina. De facto, o *threshold* renal dos níveis de ascorbato no plasma é entre 0.8 e 1.4 mg/dL (González, et al., 2005; Helwig).

1.2.2. Transporte

Os sistemas de transporte associados à membrana plasmática celular determinam a distribuição da vitamina C entre os fluidos extra e intracelulares. A

difusão simples, a difusão facilitada e os mecanismos de transporte activo contribuem para o transporte do AA ao nível da membrana celular. A difusão simples poderá ocorrer ao nível da boca e do estômago, porém, considera-se ser apenas uma pequena percentagem de captação. Isto porque, o facto de ser um composto polar e de possuir massa molecular relativamente grande não lhe permite atravessar rapidamente a membrana. Assim sendo, o fluxo da vitamina C para dentro e fora da célula é essencialmente controlado por difusão facilitada e transporte activo, os quais são mediados por proteínas membranares de classes distintas, transportadores de glicose (*GLUT – glucose transporters*) e transportadores de vitamina C dependentes de sódio (*SVCT – sodium vitamin C cotransporters*), respectivamente (Padayatty, et al., 2001; Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

Tal como supracitado, quando actua como antioxidante ou cofactor enzimático, o AA é oxidado em DHA. Para ambos os sistemas que medeiam o transporte do AA e do DHA, as taxas de *uptake* inicial saturam com o aumento da concentração de substrato externo, reflectindo interacções de elevada afinidade que poderão ser robustamente modeladas pela cinética de *Michaelis-Menten*. A equação de *Michaelis-Menten* (1) descreve a relação quantitativa entre a velocidade inicial V_0 , a velocidade máxima $V_{máx}$, a concentração inicial de substrato $[S]$ e a constante de *Michaelis* K_m , que representa a concentração de substrato necessária para atingir metade da $V_{máx}$, medindo a afinidade de uma enzima pelo substrato (Wilson, 2005; Mariotto, 2006).

$$V_0 = \frac{V_{máx} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

1.2.2.1. Transporte indirecto via GLUTs

O DHA passa através da membrana por um mecanismo específico de difusão facilitada, transporte a favor do gradiente, mediado pelos GLUT. Este mecanismo é usado indirectamente pela célula para transportar a forma reduzida da vitamina C, o AA, para o seu interior, através de três passos: oxidação extracelular do AA com formação de DHA, seguida do transporte do DHA pelos GLUT para o interior da célula e, posteriormente, a redução intracelular do DHA em AA (Figura 2). Este processo desenrola-se devido ao facto da glicose inibir a captação de AA, mas não o de DHA. Contudo, verifica-se uma competição entre as moléculas de DHA e glicose pelas GLUT, a qual é dependente do tipo de células em questão e, consequentemente, interfere na captação de ambas. Além da inibição pela glucose, os GLUT estão também sujeitos a um controlo hormonal (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

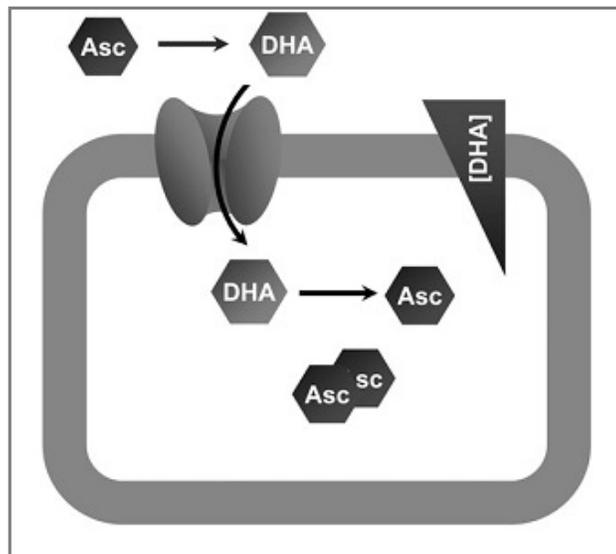


Figura 2 - Mecanismo de transporte da vitamina C pelas GLUT. No meio extracelular o AA é oxidado a DHA. O DHA é importado pelos GLUT a favor do gradiente de concentração e novamente reduzido a AA no interior da célula. Retirado de (Li, et al., 2007).

Tendo por base a afinidade do DHA para os GLUT, estudos realizados comprovam que entre as várias isoformas GLUT, as GLUT1 e GLUT3 são responsáveis pelo influxo do DHA. Estas estão essencialmente presentes nos osteoblastos, células musculares e retinianas, mediando assim o influxo de DHA nas mesmas. As GLUT1 são também expressas nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica e poderão ser parcialmente responsáveis pela acumulação da vitamina C no cérebro o que, no entanto, se torna insignificativo face à acumulação da mesma pelos SVCT (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

É de suma importância referir que o mecanismo de difusão facilitada pelas GLUT tem sido implicado na protecção contra o stresse oxidativo, assunto que será abordado com maior detalhe posteriormente (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

1.2.2.2. Transporte directo via SVCTs

Como referido anteriormente, a vitamina C pode ser directamente transportada para o interior das células por mecanismos de transporte activo controlado pelas SVCT (Figura 3). Baseado nos valores de constantes K_m , os SVCT têm maior afinidade para o AA do que os GLUT e são, por isso, considerados os transportadores com maior afinidade para a vitamina C. Este mecanismo é um exemplo de transporte activo secundário, visto que permite o transporte do AA através da membrana celular, a favor do gradiente electroquímico de sódio, mantido pela bomba sódio-potássio (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

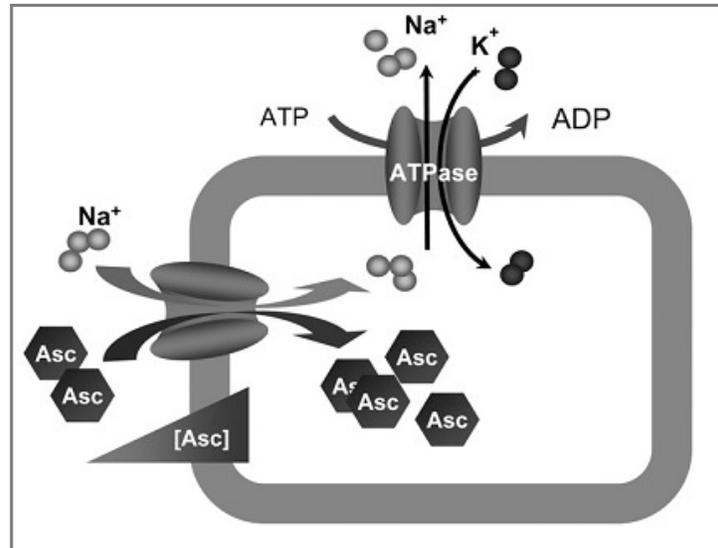


Figura 3 - Mecanismo de transporte da vitamina C pelos SVCT. O AA é transportado por um mecanismo de transporte acoplado ao sódio. Consequentemente, o excesso de sódio intracelular é activamente exportado por troca de potássio extracelular através da bomba sódio-potássio ATPase. Retirado de (Li, et al., 2007).

Tal como os GLUT, os SVCT possuem duas isoformas: SVCT1 e SVCT2, cuja análise revela que o SVCT2 tem maior afinidade, porém, menor capacidade de transporte do AA que o SVCT1. Contudo, é ainda desconhecido se esta característica do SVCT1 é uma propriedade inerente à mesma ou se é simplesmente resultado da existência desta proteína em maior concentração na membrana plasmática do que o SVCT2. Para além desta diferença, estas duas isoformas possuem também distribuições e funções distintas: o SVCT1 expressa-se predominantemente nas células epiteliais, nomeadamente do intestino, rim e fígado, e pode transportar quantidades de ascorbato superiores às necessidades destas células. Por outro lado, o SVCT2 está presente em células especializadas e metabolicamente activas, tais como, células do cérebro, olho e placenta e pensa-se estar envolvido na manutenção dos níveis intracelulares de vitamina C vitais para a função neuronal e protecção contra o stresse

oxidativo. De realçar que a maior capacidade de transporte do SVCT1 é apropriada às células epiteliais que transportam quantidades de AA superiores às que necessitam para o seu uso interno. Por outro lado, as afinidades de ambas as proteínas são suficientemente elevadas para permitir às células absorver eficazmente o AA do fluido extracelular onde, na maioria dos tecidos, excepto estômago, olho e sistema nervoso central, a concentração de AA é aproximadamente os 20 – 80 μM normalmente encontrados no plasma (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

O cotransporte do AA dependente de sódio pode ser cineticamente regulado pela alteração das concentrações dos substratos transportados ou pelo potencial de membrana. A expressão do SVCT1 é atenuada por elevadas concentrações de AA *in vitro*. Consequentemente, a subregulação do SVCT1 pode limitar a concentração máxima de vitamina C plasmática atingível por ingestão oral. De modo semelhante, o SVCT2 é sensível a alterações dos níveis intracelulares de AA, o que poderá desempenhar um papel regulador na manutenção da homeostase do AA no interior da célula (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

À medida que a concentração intracelular do AA aumenta a níveis farmacológicos, a taxa de transporte do mesmo é atenuada. Consequentemente, os níveis fisiológicos normais do AA são restabelecidos, o que constitui um obstáculo às estratégias de obtenção de doses elevadas de vitamina C, tendo em vista a protecção antioxidante e/ou outro benefício clínico conferido pela mesma. Uma consequência importante da regulação do substrato poderá ser a maior eficiência verificada na absorção ao nível do intestino, na conservação pelo rim e na captação pelas células alvo de doses descontinuadas, mais do que a eficiência revelada com a administração contínua de AA. Tal como referido anteriormente, o fluxo de AA pode também ser

controlado por alterações do potencial de membrana, na medida em que os transportadores SVCT implicam o envolvimento de dois catiões sódio para cada anião ascorbato transportado. As variações do potencial de membrana conduzem à alteração do gradiente electroquímico e, conseqüentemente, da energia livre do sistema de transporte. Mais particularmente, a despolarização da membrana abranda a captação de AA para o interior da célula (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

Para além dos factos referidos, o transporte do AA pode também ser regulado pelo pH, sendo 7,5 o valor considerado óptimo para que ocorra o transporte através dos SVCT. Isto é, a acidificação dos meios extracelular e/ou citoplasmático inibe o transporte do AA, visto que a potência dos prótons excede aquela que pode ser explicada pela protonação do ascorbato; assim sendo, os prótons inibem os sistemas de transporte podendo actuar directamente nas proteínas transportadoras, reduzindo assim, a afinidade das mesmas para o ascorbato (Wilson, 2005).

É deveras importante enfatizar que os mecanismos de transporte da vitamina C variam conforme os tipos celulares em questão, nas quais o transporte pode ser alterado consoante a afinidade de ligação do substrato, a capacidade de translocação de cada transportador ou o número de proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática (Wilson, 2005; Li, et al., 2007).

Em suma, os dois maiores transportadores de vitamina C, os GLUT e os SVCT, regulam os níveis da mesma, tendo por isso que ser considerados em tratamentos que têm como objectivo atingir níveis elevados de vitamina C intracelular. Métodos alternativos de administração de vitamina C, tais como a administração intravenosa (i.v.), permitem aumentar temporariamente a concentração efectiva de vitamina C intracelular a níveis farmacológicos. Por outro lado, tratamentos que alteram a

actividade dos transportadores de vitamina C específicos podem potenciar a acumulação localizada de ascorbato e por isso ser utilizados em casos em que o alvo da terapia é um tecido específico. Contudo, algumas destas estratégias requerem o conhecimento mais aprofundado da actividade fisiológica e distribuição nos tecidos dos vários transportadores *in vivo* (Li, et al., 2007).

1.3. Vitamina C & Cancro

O cancro é um problema global de saúde pública com níveis de mortalidade acrescidos nos últimos anos (Figura 4). Durante as últimas três décadas, tentativas extensivas têm sido feitas tendo em vista o tratamento do cancro e, conseqüentemente, os consideráveis benefícios para o doente que se poderão atingir (Lee, et al., 2003).

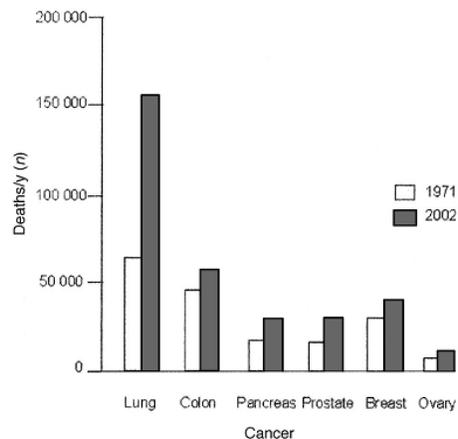


Figura 4 - Total de mortes por ano devido a cancro nos Estados Unidos nos anos 1971 e 2002.

Retirado de (Lee, et al., 2003).

A eficácia das terapias antitumorais padrão como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, parece ter atingido um patamar. Conseqüentemente, abordagens adicionais e inovadoras para o tratamento do cancro deverão ser desenvolvidas. Uma

das promissoras abordagens que se tem evidenciado relaciona-se com as vitaminas antioxidantes, de tal forma que nos últimos anos, o seu potencial quimiopreventivo tem sido consideravelmente analisado. Estudos epidemiológicos e laboratoriais indicam que um elevado consumo de vegetais e frutos ricos em antioxidantes poderão diminuir o risco de cancro. Paralelamente, elevadas concentrações destes inibem o crescimento de várias células tumorais, reduzem a toxicidade nas células normais e melhoram o efeito dos agentes terapêuticos *in vitro* e *in vivo*. Contudo, os aspectos críticos do uso de doses elevadas de antioxidantes em combinação com a radio e a quimioterapia residem essencialmente no receio de que as vitaminas antioxidantes protejam tanto as células normais como as tumorais dos radicais livres produzidos pela irradiação e pela maioria dos agentes quimioterapêuticos. No entanto, tais preocupações já foram consideradas inválidas com base em vários estudos experimentais e/ou clínicos realizados e publicados (Moss, 2006; Walingo, 2005; Lee, et al., 2003; Prasad, et al., 1999).

No que diz respeito aos mecanismos de acção dos antioxidantes, é sabido que muito ainda há para explorar; contudo, existem dados consideráveis que permitem sugerir que determinados antioxidantes, administrados sob circunstâncias controladas, poderão significativamente aliviar os efeitos indesejáveis das já referidas terapias, e longe de prejudicar os seus benefícios, poderão mesmo contribuir para a melhoria das mesmas. Cada vez mais doentes têm usado suplementos nutricionais que incluem antioxidantes a par das terapias convencionais. De facto, 60% dos doentes portadores de cancro usam vitaminas, e têm reportado melhor qualidade de vida do que os restantes (Deuter; Moss, 2006; Walingo, 2005; Lee, et al., 2003).

Os antioxidantes protegem o organismo da exposição a factores ambientais e a radicais livres destrutivos, produzidos aquando da utilização do oxigénio para produzir energia. O efeito dos antioxidantes no crescimento, diferenciação e morte das células tumorais tem sido estudado em modelos de culturas celulares, em modelos animais com tumores, nomeadamente, em ratinhos atímicos e em doentes com determinado tipo de tumores. Estes estudos têm revelado que as vitaminas, quando usadas isoladamente, podem induzir apoptose selectiva e inibir ou estimular o crescimento das células cancerígenas, dependendo da concentração. Estes efeitos dependem do tipo, forma, taxa de administração e concentração das vitaminas e do tipo de tumor (Moss, 2006; Walingo, 2005; Lee, et al., 2003; Prasad, et al., 1999).

A vitamina C tem sido considerada um dos mais importantes antioxidantes, e consequentemente, das vitaminas com maior potencial para a terapia do cancro. Assim, o seu estudo tem incidido essencialmente em duas vertentes: os efeitos de elevadas concentrações de AA no desenvolvimento e progressão de tumores e os mecanismos de acção que poderão contribuir para o seu efeito anti-cancerígeno. Apesar de ter uma história bastante controversa na terapia do cancro, contudo, cada vez mais se considera o AA um importante agente terapêutico para o tratamento do cancro (González, et al., 2005; Li, et al., 2007).

Alguns estudos em doentes portadores de cancro evidenciam que a concentração de vitamina C plasmática está inversamente relacionada com a mortalidade devido a cancro. Contudo, resultados contraditórios têm também sido reportados. A inconsistência da correlação vitamina C – cancro e a escassez de dados validados para a sua acção terapêutica têm sido pontos de impedimento à

exequibilidade do uso da vitamina C no tratamento e prevenção do cancro (González, et al., 2005; Li, et al., 2007; Walingo, 2005).

A ideia do uso da vitamina C como agente terapêutico foi inicialmente proposta há cerca de 50 anos atrás por *McCormick*, que postulou que o AA conferia protecção contra o cancro pela sua acção no aumento da síntese de colagénio. Posteriormente, *Cameron et al.* num estudo controverso mostrou que a administração de elevadas concentrações de AA contribuía para a redução do crescimento de vários tumores humanos, assim como, para o aumento do tempo de sobrevivência de doentes com cancro terminal. *Cameron e Campbell* em 1974 publicaram um estudo que incluía 50 pacientes, de entre os quais alguns pareceram demonstrar benefícios do tratamento com elevadas doses de AA em administração contínua por via intravenosa (i.v.) e oral. *Cameron e Pauling* continuaram os estudos, mas agora em doentes nos quais a terapia convencional se mostrou ineficaz. Concluíram então que doses elevadas de AA aumentavam a sobrevivência e contribuía para a melhoria da qualidade de vida e bem-estar (Cameron, et al., 1974; Padayatty, et al., 2005; Li, et al., 2007; Padayatty, et al., 2006).

A inconsistência do potencial terapêutico da vitamina C surgiu em consequência dos estudos realizados por *Cameron* não terem sido randomizados nem ter havido um grupo controlo, levando à sua não-aceitação pela comunidade científica. Paralelamente, *Moertel* efectuou dois estudos, estes sim randomizados e incluindo grupo controlo, com cerca de 100 doentes com cancro em estado avançado, aos quais foram administradas doses elevadas de AA via oral. Os resultados por *Moertel* obtidos não revelaram quaisquer benefícios para os doentes. Ambos os factos conduziram

durante anos à descredibilização do efeito terapêutico da vitamina C (Padayatty, et al., 2004; Padayatty, et al., 2005; Padayatty, et al., 2006; Li, et al., 2007).

Contudo, novos conhecimentos da farmacocinética e da farmacodinâmica do AA, assim como, a disponibilidade de novos dados clínicos têm permitido uma compreensão mais completa destes aspectos críticos, na medida em que têm aperfeiçoado a compreensão, tanto da regulação dos mecanismos de transporte da vitamina C, como da evidência da eficácia terapêutica da mesma, estimulando o interesse da reavaliação da sua aplicação na prevenção e tratamento do cancro (Padayatty, et al., 2001; Chen, et al., 2005; González, et al., 2005; Li, et al., 2007).

1.3.1. Administração i.v. vs. oral

Tal como citado anteriormente, após *Cameron, Campbell e Pauling* reportarem efeitos benéficos do uso de elevadas doses de vitamina C no tratamento do cancro, estudos clínicos aleatórios realizados por *Moertel* não apresentaram quaisquer benefícios para os doentes, e conseqüentemente, o potencial terapêutico do AA foi julgado como ineficaz, e descartado. Porém, um facto de extrema relevância pode explicar os resultados contraditórios: as diferentes concentrações de vitamina C plasmática atingidas por diferentes métodos de administração. Nos estudos de *Cameron et al.* a vitamina C foi administrada via i.v. e oral, enquanto nos estudos de *Moertel* foi administrada unicamente por via oral, o que invalida a comparação dos resultados (Padayatty, et al., 2004; Padayatty, et al., 2005; Li, et al., 2007).

As taxas de administração oral ou i.v. podem produzir concentrações plasmáticas de vitamina C substancialmente diferentes. Resultados obtidos em

estudos farmacocinéticos realizados em pessoas saudáveis demonstram que, quando administrada oralmente, as concentrações plasmáticas de vitamina C são restritamente controladas. Tanto a toma de suplementos orais como a ingestão de alimentos ricos em vitamina C não alteram em grande escala os valores normais das concentrações plasmáticas da mesma. O consumo de frutos ou vegetais 5 a 9 vezes por dia permite atingir concentrações plasmáticas de 80 μM ou até menos; mesmo com a administração oral diária de 3 g (em 6 vezes) os valores não excedem os 220 μM . Por outro lado, doses intravenosas poderão originar concentrações 30 a 70 vezes superiores ao máximo de doses orais toleradas, isto é, pode atingir concentrações superiores a 15000 μM . Esta discrepância pode ser devida ao facto da administração oral ser limitada pela eliminação do excesso de AA pelos rins. Por sua vez, a injeção i.v. como prescinde do sistema de reabsorção renal, permite a obtenção de concentrações de AA plasmático muito mais elevados. De referir que ambos os resultados têm relevância clínica, visto que estudos realizados mostram que é possível, *in vivo* e por injeção i.v., manter os níveis de AA suficientemente elevados para que este possa actuar como um agente terapêutico (Padayatty, et al., 2004; Li, et al., 2007).

Estudos *in vitro* revelam que concentrações fisiológicas de AA (0,1 mM) não mostraram quaisquer efeitos nem em células tumorais nem em normais. Todavia, em concentrações farmacológicas (0,3-20 mM), atingíveis *in vivo* via i.v., o AA mata selectivamente células tumorais. Esta acção citotóxica é explicada pela propriedade pró-oxidante da vitamina C, a qual, em concentrações elevadas, medeia a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS – *reactive oxygen species*), que actuam como potentes oxidantes intracelulares (Li, et al., 2007).

1.3.2. Stresse Oxidativo

Paralelamente, e correlacionados com os estudos clínicos que têm sido feitos para avaliar os efeitos anti-cancerígenos das elevadas doses da vitamina C, estudos experimentais têm sido desenvolvidos, com o objectivo de investigar os mecanismos de acção do AA que contribuem para o seu efeito terapêutico. Estes estudos incluem as funções antioxidante e pró-oxidante da vitamina C, a sua capacidade de modular a transdução de sinal e a expressão génica, e o seu potencial papel citotóxico nas metástases tumorais. Embora a vitamina C seja conhecida por estimular a função imunitária, inibir a formação de nitrosaminas e bloquear a activação metabólica de carcinogéneos, os seus efeitos preventivos poderão estar sobretudo associados à protecção contra o stresse oxidativo. Em concentrações fisiológicas, a vitamina C é um potencial “removedor” de radicais livres no plasma, protegendo as células de lesão oxidativa causada pelas espécies reactivas de oxigénio (Li, et al., 2007; Lee, et al., 2003; Valko, et al., 2007; Ribeiro, 2000; Lutsenko, et al., 2002)).

Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos de moléculas contendo um ou mais pares de electrões desemparelhados em orbitais atómicas ou moleculares, o que usualmente lhes confere um grau de reactividade química elevado (Valko, et al., 2007).

As ROS, tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}) e o oxigénio singleto (1O_2) são produtos do metabolismo celular normal, produzidos pelas células por várias vias, sendo o seu maior produtor a mitocôndria. Mais especificamente, são normalmente produzidas por enzimas altamente reguladas, como as isoformas das NADPH oxidase, embora a sobreprodução

das ROS resulte, essencialmente, da redução incompleta do oxigénio na cadeia respiratória mitocondrial. Aqui ocorre o transporte de electrões, através de vários complexos enzimáticos, com redução de oxigénio a água e consequente síntese de ATP. A redução incompleta do oxigénio ou a estimulação excessiva da NADPH oxidase por citocinas são então mecanismos responsáveis pela formação destas espécies reactivas (Lee, et al., 2003; Valko, et al., 2007).

As ROS, apesar de reactivas, possuem uma semi-vida biológica curta e, consequentemente, uma acção a nível celular de carácter transitório. A Figura 5 apresenta algumas das reacções de formação das ROS. A presença de metais de transição descompartmentalizados conduz à formação do radical hidroxilo altamente reactivo, pelas reacções de *Fenton* (eq. 2) e *Haber-Weiss* (eq. 3) (Valko, et al., 2007; Ribeiro, 2000).

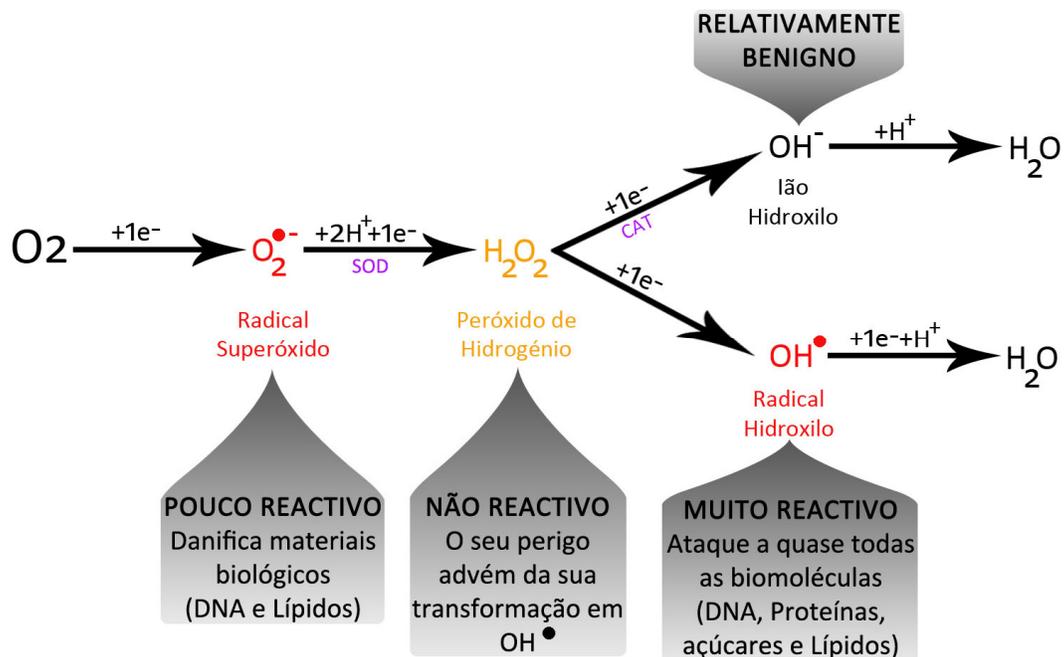
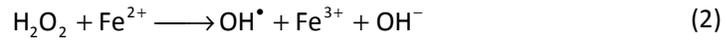


Figura 5 - Formação das ROS e sua relação com os sistemas biológicos. Estão ainda representadas as defesas antioxidantes enzimáticas, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), responsáveis pela destoxificação do radical superóxido (O₂^{•-}) e do peróxido de hidrogénio (H₂O₂), respectivamente.



As ROS e o stresse oxidativo (SO) têm sido implicados em múltiplos processos fisiológicos, tais como, no envelhecimento, na activação de vias de transdução de sinal envolvidas no crescimento, diferenciação e morte celular, na função imunitária e em várias doenças, como a aterosclerose e o cancro. Alguns destes processos estão relacionados com a concentração das ROS e, conseqüentemente, com o nível de SO. Em baixas concentrações, as ROS podem induzir a proliferação celular, enquanto que em elevadas concentrações podem activar vias de sinalização celular que conduzem à paragem do ciclo celular e à morte celular por apoptose e/ou necrose (Figura 6) (McEligot, et al., 2005; Li, et al., 2007; Ribeiro, 2000).

A apoptose é um processo de morte celular programada, resultado da activação de um programa genético de suicídio celular, dependente de ATP (trifosfato de adenosina). São características de morte por apoptose a retracção de volume, a formação de *blebs* na membrana plasmática, que se mantém íntegra, e a fragmentação nuclear com formação de corpos apópticos. Pelo contrário, a necrose é um tipo de morte celular muito mais violenta, que ocorre quando a célula é exposta a um estado de stresse extremo; neste caso, a membrana plasmática é destruída, o conteúdo citoplasmático extravasa para o exterior e apenas o núcleo mantém a sua integridade (Ribeiro, 2000).

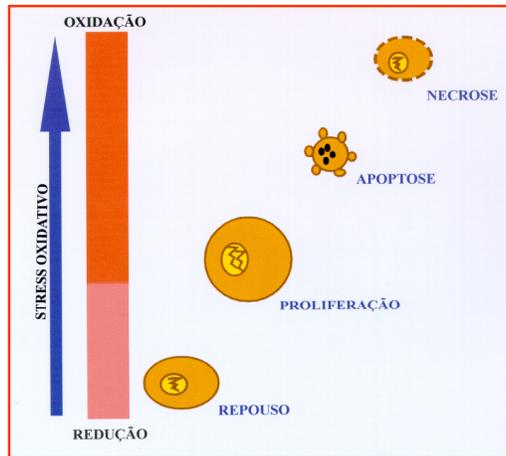


Figura 6 - Participação do stresse oxidativo na proliferação e morte celular. Retirado de (Ribeiro, 2000).

O balanço entre ambos os efeitos das ROS é obtido por mecanismos de “regulação redox”, responsáveis pela protecção dos seres vivos do stresse oxidativo e manutenção do “equilíbrio redox”, permitindo o funcionamento celular normal. Em condições patológicas o estado redox da célula pode ser alterado para valores divergentes dos normais, originando o estado de doença (Li, et al., 2007; Lee, et al., 2003; Valko, et al., 2007).

1.3.2.1. Efeito antioxidante

Como vimos, apesar da produção de ROS resultantes do metabolismo celular, a homeostasia é mantida por sistemas que envolvem: mecanismos de prevenção, de reparação, defesas físicas e defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem: a superóxido dismutase (SOD) enzima responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, a peroxidase do glutatião (GPx) que actua na remoção do H_2O_2 , a catalase (CAT) responsável pela destoxificação do H_2O_2 . Por outro

lado, as não-enzimáticas são, entre outras, o AA, o α -tocopherol (vitamina E), a glutationa reduzida (GSH), os carotenóides e os flavonóides (Valko, et al., 2007).

Um elevado estado oxidativo no interior da célula pode ser extremamente nocivo, resultando na produção de radicais livres, que por sua vez conduzem à peroxidação lipídica, mutações do ADN implicadas na iniciação de tumores, e nitrosilação e formação de ligações dissulfeto em proteínas. Por sua vez, o aumento da produção de ROS causado pela exposição a agentes carcinogénicos, actuando nas células normais, pode resultar na iniciação, promoção e consequente progressão do cancro e outras doenças degenerativas (Figura 7) (Li, et al., 2007; Lee, et al., 2003).

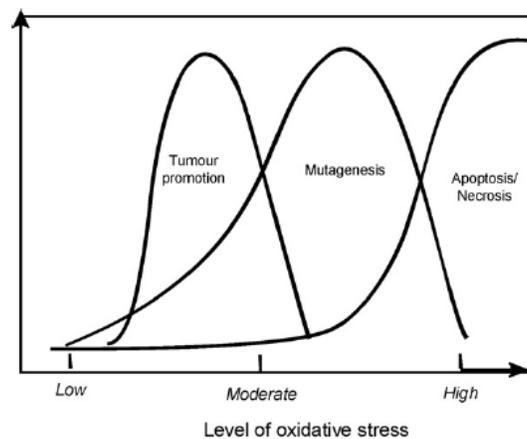


Figura 7 – Relação entre o nível de stress oxidativo e os processos de promoção do tumor, de mutagénese e de apoptose/necrose. Retirado de (Valko, et al., 2007).

O desequilíbrio redox celular induzido pelo stress oxidativo relaciona-se com a estimulação oncogénica, visto ter sido descoberto estar presente em várias células cancerígenas em comparação com células normais. Como referido anteriormente as ROS lesam o ADN e interferem na expressão de alguns genes envolvidos na regulação de várias vias de transdução de sinal, podendo estar implicadas no processo de carcinogénese. Consequentemente, os antioxidantes poderão ajudar a prevenir e

tratar o cancro por vários mecanismos, tais como, pela preservação da regulação do ciclo celular normal, pela inibição da proliferação celular anómala e indução da apoptose, pela inibição da invasão tumoral, angiogénese e inflamação (Valko, et al., 2007).

Como antioxidante, o principal papel da vitamina C é neutralizar os radicais livres, pois estes necessitam de um par de electrões para recuperar a sua estabilidade. Como a vitamina C é uma excelente fonte de electrões pode doar-lhes electrões e extinguir a sua reactividade, reflectindo desta forma a sua capacidade como agente redutor, reduzindo potencialmente o stresse oxidativo. Este mecanismo é manifesto numa série de funções citopreventivas sob condições fisiológicas, as quais incluem a prevenção de mutações do ADN, impedindo a oxidação das bases, a protecção dos lípidos membranares da lesão peroxidativa e a reparação de resíduos aminoácidos oxidados mantendo assim a integridade proteica. Tendo em conta, que as mutações do ADN são as maiores responsáveis pelo desenvolvimento do cancro, a atenuação da oxidação intracelular pela vitamina C constitui um potencial mecanismo anticancerígeno (Li, et al., 2007; Lee, et al., 2003).

1.3.2.2. Efeito pró-oxidante

Paradoxalmente, estudos em várias linhas celulares diferentes revelam que elevadas concentrações de AA produzem efeitos citotóxicos associados à inibição da proliferação celular. Estes estudos têm associado este efeito citotóxico do AA ao facto deste poder desempenhar funções como pró-oxidante, isto é, promovendo o stresse oxidativo. A actividade pró-oxidante da vitamina C pode ocorrer devido à presença de

metais livres de transição como o cobre e o ferro. Assim, o AA *in vitro* reduz o íão ferro livre, o qual pela reacção de *Fenton* (eq. 2) produz radicais hidroxilo a partir de H₂O₂. Este radical, extremamente reactivo, reage rapidamente com macromoléculas celulares críticas, como o ADN, o que poderá originar a mutagénese e consequente iniciação do cancro. O potencial pró-oxidante intrínseco da vitamina C poderá contribuir para as suas propriedades citotóxicas selectivas, visto que se revela ser mais evidente em células tumorais causando a sua morte (González, et al., 2005; Li, et al., 2007; Lee, et al., 2003).

Sumariamente, as funções da vitamina C como pró-oxidante e/ou antioxidante são determinadas, pelo menos, por três factores: o potencial redox no ambiente celular, a presença ou ausência de metais de transição e as concentrações locais de AA (Li, et al., 2007).

1.3.3. Citotoxicidade selectiva

Para além das vantagens supracitadas, a vitamina C possui outras vantagens que a distinguem de outros agentes quimioterapêuticos. Além de matar preferencialmente as células neoplásicas, não suprime o sistema imunitário, como outros agentes citotóxicos, nem provoca a supressão da medula óssea. Para além disso, aumenta a resistência animal e humana a agentes infecciosos, melhorando a linfopoiese e a imunidade celular, a actividade bactericida dos neutrófilos e a modulação de proteínas complementares. Refere-se também a sua importância no fortalecimento da integridade estrutural da matriz extracelular, a qual é responsável pela resistência do estroma à invasão por células malignas (Riordan, et al., 1994).

Dados recentemente obtidos revelam algumas informações deveras importantes para a abordagem deste trabalho. Estudos *in vitro* mostram que concentrações farmacológicas de AA (0,3-20 mM) matam as células tumorais, preservando as células normais (efeito verificado em várias linhas celulares diferentes). Esta resposta anti-cancerígena selectiva é dependente do tempo de incubação do AA e da sua concentração extracelular, sendo independente da concentração intracelular do mesmo. Quanto ao mecanismo de transporte da vitamina C nas células tumorais, sabe-se que é efectuado somente pelos GLUT. Por outro lado, a morte celular pode depender da formação de ROS mediada pela oxidação metabólica do AA em DHA. De referir que as concentrações de AA necessárias para este efeito citotóxico selectivo podem ser atingidas por administração i.v. e em condições que reflectem um potencial uso clínico (Agus, et al., 1999; Chen, et al., 2005; Riordan, et al., 1994; Padayatty, et al., 2005; Li, et al., 2007).

Apesar de tudo, o mecanismo de citotoxicidade selectiva ainda não é conhecido; no entanto, existem algumas possibilidades que incluem a estimulação das vias apoptóticas e o dano pró-oxidante acelerado que não pode ser reparado pelas células tumorais. Estes factores estão estreitamente relacionados com várias propriedades intrínsecas das células tumorais, nomeadamente, a diminuição das concentrações de enzimas antioxidantes (como a catalase e a SOD), o aumento da disponibilidade de metais de transição e o aumento da oxidação do AA que em elevadas concentrações plasmáticas, associado à sobreexpressão das GLUT, promove a acumulação do metabolito instável DHA, o que poderá ser tóxico. Todas estas propriedades intrínsecas contribuem para o incremento das concentrações intracelulares de ROS (Padayatty, et al., 2005; Li, et al., 2007).

Assim, o aumento da produção de ROS mediado pela vitamina C, associado à deficiência da actividade da catalase nas células neoplásicas e à deficiência de metais de transição descompartmentalizados poderá redundar na citotoxicidade selectiva da vitamina C e conseqüente revelação do seu potencial terapêutico (González, et al., 2005; Drisko, et al., 2003; Riordan, et al., 1997).

Capítulo II

Métodos

O potencial terapêutico da vitamina C tem vindo a ser, cada vez mais, alvo de atenção por muitos autores, adquirindo maior ênfase na última década. Todavia, os mecanismos de citotoxicidade selectiva ainda não são conhecidos, o que abre caminho para novos estudos que forneçam conhecimento sobre os mesmos.

No presente trabalho, pretende-se avaliar a citotoxicidade das duas formas da vitamina C, recorrendo a estudos bioquímicos e imagiológicos.

Para tal, pretendeu-se desenvolver uma formulação farmacêutica, pela marcação radioactiva da forma reduzida do ácido ascórbico (AA) com ^{99m}Tc , com a optimização das diferentes condições, para obtenção de um elevado grau de pureza radioquímica. Após obtenção do complexo marcado ($^{99m}\text{Tc-AA}$), pretendeu-se realizar estudos com imagiologia $^{99m}\text{Tc-AA}$, com o intuito de averiguar a presença intra e extracelular da vitamina C, usando uma linha celular de adenocarcinoma do cólon (WiDr), estudos que puderam ser complementados com estudos de estabilidade das duas formas da vitamina C, por HPLC.

Paralelamente, pretendeu-se avaliar a citotoxicidade do AA e do ácido dehidroascórbico (DHA) em células de adenocarcinoma do cólon (WiDr), recorrendo a diversos métodos bioquímicos, nomeadamente, colorimetria e citometria de fluxo. Desta forma, pretendeu-se avaliar a proliferação, viabilidade e morte celular, assim como, possíveis intervenientes nos mecanismos responsáveis pela citotoxicidade da vitamina C, tais como, espécies reactivas de oxigénio e o potencial de membrana mitocondrial.

2.1. Estudos de Química

2.1.1. Preparação do $^{99m}\text{Tc-AA}$

A marcação radioactiva do ácido ascórbico necessita da adição de um agente redutor, previamente à mistura com o ^{99m}Tc , constituindo-se assim uma formulação farmacêutica. Para a constituição desta formulação, usámos inicialmente o cloreto de estanho dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); contudo, este agente redutor tornou-se ineficaz, pelo que foi abandonado, dada a reduzida pureza radioquímica e estabilidade temporal do composto obtido. Posteriormente, testou-se o cloreto de ferro (III) (FeCl_3), o que permitiu atingir valores de estabilidade muito maiores. A optimização desta marcação radioactiva foi obtida após variação da concentração do ligando e do agente redutor, da actividade do radionuclido, da temperatura e do pH. Após a avaliação destas condições, desenvolvemos uma metodologia de marcação em duas fases. Na primeira fase, à actividade de 296-370 MBq de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$), num volume de 3 mL, adicionaram-se, em frasco previamente argonado, 0,2 mL de FeCl_3 0,1 N (em HCl 0,1 N). Na segunda fase, 200 mg de ácido ascórbico (A5960, Sigma) são adicionados à solução inicialmente obtida. Após leve agitação, o pH foi levado a 6,5 pela adição de 1,2 mL de uma solução de NaOH 1 M, o que foi confirmado pelo método de comparação de cores (pH-Fix 4.5-10.0, Machenerey-Nagel). Todo o procedimento de marcação decorreu em atmosfera argonada e com protecção da luz e, após marcação, a solução foi mantida a 0 °C durante pelo menos 3 horas.

2.1.2. Controlo de Qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$

Posteriormente ao processo de marcação da forma reduzida da vitamina C, foi realizado o controlo de qualidade com o objectivo de determinar a pureza radioquímica do complexo. A pureza radioquímica de um radiofármaco é a fracção da radioactividade na forma química desejada em relação à radioactividade total. As impurezas radioquímicas são decorrentes da possível ineficiência do processo de marcação, resultando da decomposição do complexo devido a acções do solvente, mudanças de temperatura ou pH, acção da luz, presença de agentes redutores ou oxidantes, e radiólise dos constituintes. Exemplos destas são o tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o tecnécio reduzido e hidrolizado ($^{99m}\text{Tc-RH}$). O $^{99m}\text{TcO}_4^-$ é a forma resultante do facto de não ter sido reduzido pelo agente redutor ou de estar em maior quantidade estequiométrica relativamente ao ligando. O $^{99m}\text{Tc-RH}$ constitui complexos hidrofóbicos e coloidais de tecnécio reduzido e hidrolizado não ligado provenientes da hidrólise do pertecnetato, sendo a principal causa deste facto o excesso de agente redutor. A presença destes compostos na solução do radiofármaco resulta na diminuição da qualidade das imagens devido à diferente biodistribuição das impurezas radioquímicas em relação ao complexo marcado, donde resulta uma elevada actividade no sangue e nos tecidos, que constitui a actividade de fundo. Para além disso, redundam em irradiações desnecessárias, com o conseqüente aumento da dosimetria no paciente (Robbins, 1984; Saha, 2003).

A pureza radioquímica foi determinada recorrendo a dois métodos cromatográficos: o HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta precisão) – e a microcromatografia ascendente em camada fina.

A cromatografia é um processo físico de separação baseado na distribuição dos componentes de uma mistura entre uma fase estacionária e uma fase móvel (solvente), tendo em conta as afinidades físico-químicas entre os componentes e as fases.

2.1.2.1. HPLC

A cromatografia líquida de alta precisão é um método de separação de substâncias, que constitui uma ferramenta de análise baseada em princípios de cromatografia de camada fina e cromatografia de coluna, cujo desempenho tem sido otimizado em termos de resolução, detecção, quantificação e tempo de análise. Isto é, ao invés de, ao longo de uma coluna, o solvente gotejar impelido pela força da gravidade, este é forçado a tal sob elevadas pressões, superiores a 400 atmosferas, o que diminui o tempo de análise do composto. Esta optimização inclui também a utilização de partículas de tamanho mais reduzido no material de enchimento da coluna, melhorando a área de superfície na qual se darão as interacções entre a fase estacionária (coluna) e a fase móvel (solvente). São precisamente as forças intermoleculares entre a amostra e a fase estacionária, e entre a amostra e a fase móvel, que permitem a separação dos componentes das amostras. Assim, a coluna retém os componentes que interagem mais fortemente com esta, enquanto aqueles que possuem menor afinidade química são arrastados pela fase móvel e, por isso, primeiramente detectados. Contudo, para que o processo se desenvolva é essencial que o solvente apresente características específicas. Assim sendo, é imprescindível que a fase móvel dissolva a amostra sem que ocorram quaisquer interacções químicas

entre elas, possua elevado grau de pureza (para que se possam fazer análises de elevada sensibilidade), seja compatível com o detector utilizado e que possua polaridade adequada para a separação dos componentes da amostra.

Dos vários tipos de HPLC disponíveis, usámos o HPLC de fase-reversa, no qual se utiliza uma fase estacionária não polar, e fases móveis aquosas moderadamente polares, como é o caso da água misturada com solventes orgânicos miscíveis, de que são exemplo o metanol e o acetonitrilo. Por vezes, para obter uma separação óptima dos vários componentes da amostra, usam-se dois solventes. Neste caso, é necessário ajustar-se um gradiente entre os dois com o intuito de obter a melhor separação. Após a passagem da amostra pela coluna é necessário fazer a detecção dos seus componentes, a qual pode ser realizada por espectrofotometria, electroquímica, fluorescência, espectrofotometria de massa, detecção de eventos por cintilação, entre outros. Não existe nenhum detector cujas propriedades o tornem ideal, e por isso não são versáteis nem universais, no entanto, possuem propriedades específicas da aplicação a que se destinam. Na análise de radiofármacos, tanto o monitor ultravioleta (UV) como o detector de radiação são frequentemente usados para medir a concentração dos diferentes componentes da amostra. O monitor UV mede a absorvância de luz do eluato, a qual é proporcional à concentração do soluto presente no mesmo. O detector de radiação é usado para medir a concentração dos componentes radioactivos no eluato. A maioria dos monitores de detecção por radioactividade possui cristais cintiladores entre dois fotomultiplicadores de elevada eficiência de contagem. Os sinais medidos por estes são amplificados e, posteriormente, quantificados. Esta quantificação é efectuada por um processo de integração gráfica das detecções, por cintilação, obtidas (cromatograma). O

cromatograma é obtido pela relação entre o valor real da detecção da substância e o seu tempo de retenção. Por sua vez, o tempo de retenção é o tempo que o composto leva a percorrer a distância desde a coluna até ao detector, o qual se inicia no momento em que a amostra é injectada e termina no instante em que a altura do pico, referente a este composto, é máxima. O cromatograma é obtido em contagens por segundo (CPS) em função do tempo (min) e em milivoltes (mV) em função do tempo (min) para a detecção por radioactividade e UV, respectivamente (Clark, 2007).

Desta forma, torna-se possível separar os vários componentes do radiofármaco preparado: o AA e o FeCl_3 por detecção UV e o $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$, o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e o $^{99\text{m}}\text{Tc-RH}$ por radioactividade. Para a análise por HPLC foi utilizado um equipamento *Gilson* composto por *UV/VIS-151 Detector*, *321-PUMP* e *506-C System Interface*. A definição dos métodos de corrida e o processamento dos resultados é feito usando o *software Gina-Star*, cuja base de dados armazena automaticamente todos os dados obtidos.

O método de HPLC para o controlo de qualidade do $^{99\text{m}}\text{Tc-AA}$ foi desenvolvido usando como fase estacionária uma coluna Nucleosil com pré-coluna (Hichrom, NC-100-5C18-250AF), como fase móvel um gradiente de KH_2PO_4 (0.025 M, pH 3) e metanol na proporção de 96/4 (v/v) e o fluxo constante de 1 mL/min. A detecção UV foi efectuada com o comprimento de onda de 205 nm.

Primeiramente, realizou-se uma passagem pelo sistema durante 60 minutos e com as mesmas características que serão utilizadas para o controlo de qualidade, mas sem a injeção de qualquer amostra. Esta passagem serve unicamente para estabilização do equipamento, nomeadamente, dos detectores UV e de radioactividade. Após estabilização, são injectados 25 μL de uma solução correspondente ao gradiente da fase móvel, para confirmar o desempenho do sistema.

Aos 30, 60, 120 min e 24 horas, após a preparação do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, foram retirados 25 μL do mesmo. Nos devidos tempos cada uma das amostras foi transferida para a micro seringa do HPLC (Hamilton) e injectada no *loop*, iniciando-se o método anteriormente descrito. Cada passagem teve a duração de 30 min. Obtiveram-se também cromatogramas de amostras de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$, AA frio e FeCl_3 , para tornar possível a interpretação dos cromatogramas obtidos no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$.

Após a obtenção dos cromatogramas desejados, efectuou-se uma outra passagem que constitui um método de lavagem, com as seguintes características: fase móvel com um gradiente de H_2O e metanol (p.a.)/ H_2O (9/1) iniciado na proporção de 90/10 e finalizado em 95/5 (v/v), fluxo constante de 1 mL/min, comprimento de onda de 205 nm, e duração de 60 min.

A quantificação dos componentes presentes no radiofármaco foi feita por integração gráfica do cromatograma. A integração gráfica foi feita desenhando ROIs (regiões de interesse) do tipo BB, BD e/ou DB com o intuito de minimizar o erro resultante da proximidade dos diferentes componentes do *kit*, e do consequente afastamento do cromatograma da linha basal entre os 3 e os 7 minutos. As ROIs do tipo BB são desenhadas quando os extremos do pico coincidem com a linha basal. Quando tal não acontece, desenham-se ROIs do tipo BD ou DB, traçando-se perpendiculares do lado do extremo do pico que se encontra afastado da linha basal. Desta forma, obtiveram-se as áreas sob a curva correspondentes à quantidade de radioactividade total de cada composto e foi feita a avaliação das respectivas quantidades percentuais em função da radioactividade total detectada. A pureza radioquímica do radiofármaco preparado ($^{99m}\text{Tc-AA}$) traduz-se na equação (1):

$$\%^{99m}\text{Tc-AA} = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_4^- + \%^{99m}\text{Tc-RH}) \quad (1)$$

2.1.2.2. Microcromatografia ascendente

A microcromatografia ascendente em camada fina, ao contrário do HPLC, constitui um procedimento rápido, simples e não dispendioso de separação dos componentes de uma mistura e consequente determinação da pureza radioquímica. O princípio deste método analítico é a subida da fase móvel (solvente) ao longo da fase estacionária (adsorvente). A fase estacionária constitui uma camada fina formada por um sólido granulado, disposta verticalmente e assente num suporte inerte. Uma pequena amostra da mistura a analisar é previamente colocada a 1 cm da extremidade inferior da fase estacionária, denominada origem, conforme a Figura 8. À medida que o solvente se move ao longo do adsorvente, estabelece-se um equilíbrio para cada componente da amostra, entre as moléculas da mesma que são adsorvidas na fase estacionária e as moléculas do solvente. Consequentemente, as diferentes espécies radioquímicas migram a diferentes velocidades e distribuem-se ao longo do adsorvente dependendo da sua solubilidade, capacidade de adsorção e carga (forças electrostáticas). A distância que cada componente da amostra migra é representada pelo valor de R_f (factor de retenção), o qual varia entre 0 e 1. R_f igual a 0, significa que o composto permaneceu no ponto de aplicação (origem), enquanto, R_f igual a 1, significa que o composto migrou até à frente do solvente (Peres, 2002).

A pureza radioquímica é calculada como a razão (em %) entre a radioactividade do composto marcado, neste caso, $^{99m}\text{Tc-AA}$, e a actividade total aplicada. Assim, com o intuito de se ter um método simples, eficiente e barato de realizar o controlo de

qualidade do complexo, desenvolvemos dois sistemas cromatográficos, a partir dos quais se pretende separar o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o $^{99m}\text{Tc-RH}$. Por sua vez, a percentagem de $^{99m}\text{Tc-AA}$ é obtida pelo cálculo da equação (1) anteriormente descrita.

No sistema A utilizou-se, para fase móvel, uma solução de cloreto de sódio (0,9%) e, para fase estacionária, tiras de *Instant Thin Layer Chromatography Sílica Gel* (ITLC-SG, *Pall Corporation*) de 1,5x20 cm. Com este sistema, usando um solvente hidrofílico, pretende-se separar o $^{99m}\text{Tc-RH}$, o qual permanece na origem. Devido às propriedades hidrossolúveis do AA, espera-se que o $^{99m}\text{Tc-AA}$ suba na frente do solvente arrastando o $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Por outro lado, no sistema B, utiliza-se um solvente orgânico, com o intuito de separar o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ que migra na frente do solvente, enquanto o $^{99m}\text{Tc-AA}$ e o $^{99m}\text{Tc-RH}$ permanecem na origem. Assim, neste sistema utiliza-se, para fase móvel, butanona e para fase estacionária, tiras de 31-ET (Merck) de 1x10 cm. As tiras de papel que constituem a fase estacionária foram previamente marcadas levemente, com lápis de carvão, nos comprimentos referidos na Figura 8, a partir do início da tira, consoante se trata de um tira longa ou curta.

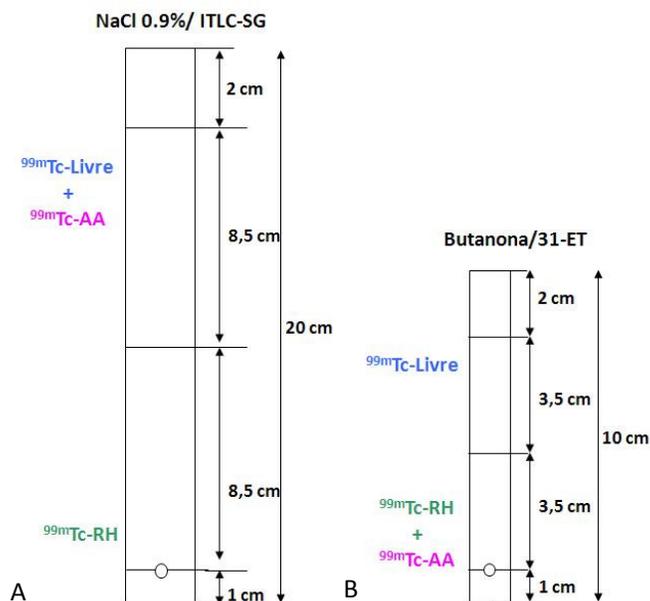


Figura 8 - Representação esquemática dos dois sistemas de microcromatografia desenvolvidos.

Primeiramente, os solventes foram colocados nos respectivos frascos, num sistema tapado para saturarem. Aos 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a marcação, uma alíquota de 2 μL do composto marcado foi, posteriormente, colocada na origem de cada uma das tiras, as quais foram rapidamente transferidas para os respectivos frascos. Após a subida do solvente, as tiras foram retiradas e cortadas, a 8,5 e 3,5 cm da origem para o sistema A e B, respectivamente. As duas porções de cada tira foram colocadas em tubos de RIA (radioimunoensaio) e, seguidamente, contadas num contador de poço (DPC Gamma C12), o qual possui 12 detectores de radiação constituídos por cristais de iodeto e sódio activado com tálio (NaI(Tl)) acoplados a tubos fotomultiplicadores. O número de interações no cristal detector do contador, dado em CPM (contagens por minuto), é proporcional à actividade presente em cada porção das tiras. Desta forma, foi quantificada a percentagem de pureza

radioquímica através da equação (1) e da quantificação prévia da percentagem de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e de $^{99m}\text{Tc-RH}$ pelas expressões (2) e (3).

$$\%^{99m}\text{Tc} - \text{AA} = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_4^- + \%^{99m}\text{Tc-RH}) \quad (1)$$

$$\%^{99m}\text{Tc} - \text{RH} = \frac{\text{CPM}_{\text{parte inferior da tira 1º sistema}}}{\text{CPM}_{\text{tira do 1º sistema completa}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%^{99m}\text{TcO}_4^- = \frac{\text{CPM}_{\text{parte superior da tira 2º sistema}}}{\text{CPM}_{\text{tira do 2º sistema completa}}} \times 100 \quad (3)$$

2.2. Estudos in vitro

Para avaliar os efeitos citotóxicos e a cinética de entrada da vitamina C foram realizados estudos *in vitro*, utilizando uma linha celular humana, de adenocarcinoma do cólon (WiDr), obtida na *American Type Culture Collection* (ATCC). A linha celular WiDr foi depositada na ATCC, como uma linha celular estabelecida a partir de um doente do sexo feminino, de 78 anos de idade, e etnia caucasiana. No entanto, foi mais tarde demonstrado que se tratava da linha celular HT-29, estabelecida em 1964, a partir do tumor primário de um doente de 44 anos com adenocarcinoma do cólon (LGC/ATCC, 2006).

É de referir que todo o material de manipulação das culturas celulares foi devida e previamente esterilizado. Da mesma forma, todos os procedimentos foram efectuados nas condições de esterilização e assepsia necessárias.

2.2.1. Culturas celulares de adenocarcinoma do cólon

A linha celular de adenocarcinoma do cólon (Widr, ATCC) foi descongelada e ampliada em cultura em monocamada a 37°C, com 5% de CO₂ (incubadora HeraCell 150) utilizando o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma D-5648) suplementado com 100 µM de piruvato de sódio (Gibco – 11360), 4,5 g/L de glicose, L-glutamina (2 mM), 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09) e 1% de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Gibco 15140-122).

Com esta linha celular, e com o objectivo de compreender o comportamento *in vitro* das duas formas da vitamina C, foram realizados estudos de captação com ^{99m}Tc-AA, estudos de estabilidade da molécula recorrendo ao HPLC, assim como, estudos de citotoxicidade utilizando o método do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide] para avaliação da proliferação celular e a citometria de fluxo para avaliação da viabilidade e morte celular.

2.2.2. Estudos de Captação

A realização dos estudos de captação implicou a preparação prévia de uma suspensão celular com 2x10⁶ células/mL. A cultura celular de adenocarcinoma do cólon foi incubada com 3 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante três minutos, para assim ocorrer desagregação celular. Seguidamente, e para inactivar a tripsina, foram adicionados à suspensão celular cerca de 8 mL de DMEM, a qual foi posteriormente centrifugada a 1000 rotações por minuto (rpm/min) durante 5

minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm). As células foram então ressuspenas em meio de cultura, para obtenção de uma concentração de 2×10^6 células/mL. Com o intuito de recuperarem do stresse causado pela acção enzimática da tripsina, foram deixadas a repousar durante 60 minutos, em dois frascos de 25 cm², à temperatura de 37 °C e numa atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após a preparação da suspensão celular, foi adicionado um volume de ^{99m}Tc-AA a cada um dos frascos, de forma a obter uma concentração de cerca de 0,925 MBq/mL e de 1,850 MBq/mL. Tubos de *ependorf* contendo 500 µL de uma solução de tampão fosfato (*Phosphate Buffer Solution* – PBS – 0,5 mg/mL ajustado a pH 7,4), foram previamente colocados no gelo para que, ao colocar as amostras da suspensão, o metabolismo celular seja reduzido. Passados 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 minutos após a adição da molécula marcada, retiraram-se três amostras de 200 µL da suspensão presente nos frascos. Para permitir a separação do *sedimento* e sobrenadante centrifugaram-se as amostras a 10000 rpm/min durante 60 segundos. O sobrenadante foi então transferido para um tubo identificado. Adicionaram-se mais 500 µL de PBS gelado ao tubo de *ependorf* contendo o sedimento e repetiu-se o procedimento de centrifugação para obter a completa rentabilização do sobrenadante.

Posteriormente, pela contagem de ambas as fracções (sedimentos e sobrenadantes) no contador de poço (DPC Gamma C12) em CPM, quantificou-se a captação percentil do ^{99m}Tc-AA traduzida pela expressão (4):

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

Os valores percentis de captação do ^{99m}Tc-AA pela linha celular de

adenocarcinoma do cólon foram posteriormente normalizados para 10^6 células.

Para além deste estudo de captação, foi realizado outro com o mesmo procedimento, no entanto, com a incubação somente de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$, para efectuar a comparação com a percentagem de captação obtida com a molécula marcada.

Na amostra incubada durante 240 minutos foi determinada a viabilidade da suspensão, pelo método descrito seguidamente.

2.2.3. Determinação da Viabilidade e Celular

A viabilidade celular foi determinada recorrendo ao método de exclusão do azul de tripano. Este método é baseado no princípio de que as células viáveis possuem membranas celulares intactas que excluem qualquer corante vital, tal como o azul tripano. Nas células mortas, o corante atravessa a membrana celular, devido ao facto desta se encontrar permeabilizada. Por conseguinte, observadas ao microscópio, as células mortas podem ser distinguidas pois aparecem coradas de azul, enquanto as vivas se encontram com aspecto brilhante (não coradas de azul). Este facto possibilita a determinação da percentagem de células viáveis, pela expressão (5):

$$\text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{N}^\circ \text{ células mortas}} \times 100 \quad (5)$$

Para o efeito, a 20 μL da suspensão celular adicionou-se, num tubo de *ependorf*, 20 μL de azul tripano. A mistura foi homogeneizada utilizando uma micropipeta e colocada num hemocítmetro para observar ao microscópio óptico

(Motic AE31) com ampliação de 10x. Efectuou-se a contagem das células vivas (brilhantes) e das células mortas (coradas de azul) nos quatro quadrantes do hemocitómetro. Posteriormente, calculou-se a viabilidade das células de adenocarcinoma do cólon, em percentagem, utilizando a expressão acima referida.

2.2.4. Estudos de estabilidade da vitamina C

A análise por HPLC permitiu não só determinar a pureza radioquímica do radiofármaco $^{99m}\text{Tc-AA}$, mas possibilitou também a análise dos compostos presentes nas culturas celulares de adenocarcinoma do cólon, permitindo estudar a estabilidade e até esclarecer os mecanismos de entrada das diferentes formas da vitamina C. Sendo as principais substâncias em questão o AA e DHA (D8132, Sigma), utilizou-se o mesmo método desenvolvido para o controlo de qualidade, portanto, nas condições anteriormente referidas de fase estacionária, fase móvel e respectivo gradiente, fluxo, comprimento de onda, volume injectado e duração da detecção. Os cromatogramas de todas as amostras foram obtidos e os respectivos tempos de retenção, posteriormente, analisados.

Definido o método no HPLC, injectaram-se as amostras, de concentrações e/ou após os tempos de incubação referidos na Tabela 1. Esta análise foi feita para obter resultados controlo, averiguando os tempos de retenção dos vários compostos, e verificando qual o efeito que o pH do meio exerce sobre as duas formas da vitamina C.

Tabela 1 – Amostras sem metabolismo celular injectadas no HPLC.

Amostra	Tempo de incubação	Concentração
AA	-	10 mM
DHA	-	10 mM
DHA filtrado	-	10 mM
DMEM	-	-
DMEM + AA	1 h	10 mM
DMEM + DHA	1 h	10 mM
DMEM	72 h	-
DMEM + AA	72 h	10 mM
DMEM + DHA	72 h	10 mM

2.2.4.1. Avaliação do meio extracelular

Para a avaliação do meio extracelular foi realizada a análise por HPLC com o AA e com o DHA, agora, com o metabolismo celular.

Uma suspensão celular com 40 000 células/mL em meio de cultura foi distribuída por placas de 48 poços contendo cada poço 600 μ L da mesma. Para a análise da estabilidade das duas formas da vitamina C por HPLC, estas foram incubadas com as concentrações e durante os tempos referidos na Tabela 2. Passado o respectivo tempo de incubação, as amostras foram filtradas, usando filtros de 0,2 μ M (Whatman FP30/0,2 Schleider & Schnell), e injectadas no HPLC para obtenção dos respectivos cromatogramas.

Tabela 2 – Amostras com metabolismo celular injectadas no HPLC.

Amostra	Tempo de incubação	Concentração
Controlo	24 h	-
AA	24 h	3 mM
AA	24 h	7 mM
AA	24 h	10 mM
DHA	24 h	3 mM
DHA	24 h	7 mM
DHA	24 h	10 mM
Controlo	48 h	-
AA	48 h	3 mM
AA	48 h	7 mM
AA	48 h	10 mM
DHA	48 h	3 mM
DHA	48 h	7 mM
DHA	48 h	10 mM
Controlo	72 h	-
AA	72 h	7 mM
AA	72 h	8 mM
AA	72 h	10 mM
DHA	72 h	8 mM

2.2.5. Determinação da citotoxicidade da vitamina C

Com o objectivo de estudar os efeitos citotóxicos da vitamina C, as células Widr foram tratadas com concentrações crescentes das duas formas da molécula, AA e DHA, e por diferentes períodos de tempo. Após incubação foi avaliada a proliferação celular, por colorimetria, e a viabilidade e a morte celular, por citometria de fluxo.

2.2.5.1. Avaliação da proliferação celular por colorimetria

Para avaliar os efeitos da vitamina C na proliferação das células de adenocarcinoma do cólon foi realizado um teste colorimétrico, o MTT.

O método do MTT é baseado na capacidade da enzima mitocondrial dehidrogenase, presente nas células viáveis, clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais *formazan* de cor azul escura. Quando as membranas celulares estão íntegras, estes cristais atravessam-nas, o que induz à sua acumulação nas células viáveis. Consequentemente, o número de células vivas é proporcional à quantidade de cristais de *formazan* produzidos (Mosmann, 1983).

Assim, para estes estudos, e à semelhança do descrito para os estudos de captação, foi necessária uma suspensão celular com 40 000 células/mL em meio de cultura. Esta suspensão foi distribuída por placas de 48 poços, contendo cada poço 600 µL da suspensão, e após 24h as células foram incubadas com diferentes concentrações de AA (0,05; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 mM) e de DHA (0,05; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10 mM). Para cada uma das concentrações dos fármacos, a proliferação celular foi avaliada às 24, 48, 72 e 96 horas, de forma a construir curvas dose-resposta.

Desta forma, depois de passado o respectivo tempo de incubação, o meio das culturas celulares foi retirado, adicionou-se 900 µL de PBS para lavagem e, posteriormente, 150 µL de uma solução de MTT (M2128, Sigma) em PBS. Passadas 3 horas, acrescentou-se 150 µL de uma solução de isopropanol ácido, com 0,04 M de ácido clorídrico (37 % fumante), e as células foram ressuspensas utilizando uma pipeta de *Pasteur*. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a

absorvância foi quantificada a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotômetro ELISA (SLT - Spectra).

2.2.5.2. Avaliação da viabilidade, morte celular e produção de ROS por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar e quantificar células ou outras partículas biológicas, pela dispersão frontal (forward scatter/FSC) e lateral da luz (side scatter/SSC) emitida por uma fonte de luz (ex. raio laser) e pela fluorescência emitida por fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais ou outros (Silva, et al.).

2.2.5.2.1. Avaliação da morte celular

Para a avaliação da morte celular efectuou-se a dupla marcação com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (IP). Há evidências de que na fase inicial da apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido do folheto interno da membrana celular, para o folheto externo. A anexina V possui elevada afinidade para fosfolípidos carregados negativamente, tais como a fosfatidilserina e, por isso, quando conjugada forma o composto fluorescente isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC), é capaz de identificar células em apoptose. Por outro lado, nas fases mais avançadas da apoptose e/ou necrose ocorre ruptura da membrana celular permitindo a entrada de iodeto de propídeo (IP), uma molécula que se intercala no ADN, emitindo fluorescência. Assim, torna-se possível detectar células viáveis (não marcadas, ou negativas, para ambos os fluorocromos), células em apoptose inicial (positivas, ou marcadas, para a anexina-V e negativas para o IP), células em apoptose tardia e/ou

necrose (positivas para ambos) e células em necrose (negativas para a anexina-V e positivas para o IP) (Darzynkiewicz, et al., 1997).

Nesta dupla marcação, foi utilizada uma suspensão celular contendo 10^6 células. Estas foram centrifugadas, a 1000 xg durante 5 min, e o sobrenadante retirado. O sedimento foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação nas condições referidas anteriormente. Seguidamente, o novo sedimento foi incubado com 100 μ L de tampão de ligação (KIT Immunotech), 1 μ L de anexina-V-FITC (KIT Immunotech) e 5 μ L de iodeto de propídeo (KIT Immunotech), durante 15 minutos, a 4 °C, e na ausência de luz. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo, utilizando um citómetro *FACSCalibur* e os comprimentos de onda de excitação de 525 e 640 nm, para a anexina-V-FITC e para o IP, respectivamente. Foram adquiridos 10 000 eventos e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o *Paint-a-Gate 3.02*, *Machintosh Software*. Os resultados são expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e baseada na positividade e/ou negatividade de marcação para a AV/IP (Chen, et al., 2008).

2.2.5.2.2. Avaliação da presença de peróxidos

A presença de ROS pode ser detectada pela marcação das células de adenocarcinoma do cólon com o *2,7 dichlorofluorescein diacetate* (DCFH-DA), um composto lipossolúvel, estável e não-fluorescente. Este composto, ao entrar nas células, é clivado por esterases intracelulares originando o *2,7 dichlorofluorescein diacetate* (DCFH), que fica retido no interior da célula. Na presença de peróxidos, ocorre oxidação do DCFH com formação de *dichlorofluorescein* (DCF), um composto

altamente fluorescente (Figura 9). Este emite fluorescência a 522 nm, após excitação no comprimento de onda de 498 nm, a qual é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente, peróxido de hidrogénio. Os resultados são assim expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) detectada (Tarpey, et al., 2003; Dikalov, et al., 2007).

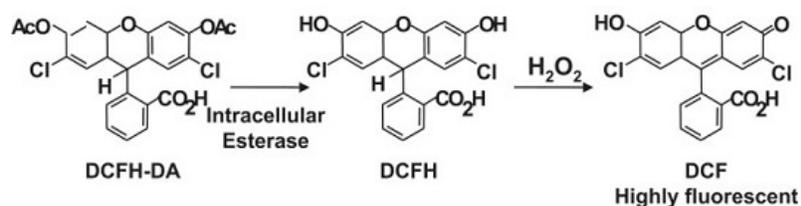


Figura 9 - Formação do composto fluorescente DCF a partir de DCFH-DA. Primeiro ocorre clivagem do DCFH-DA a DCFH pelas esterases intracelulares. O DCFH reage com H₂O₂, formando DCF.

Centrifugou-se uma suspensão celular contendo 10⁶ células, a 300 xg durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se PBS para lavar. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de PBS, e incubado durante 60 minutos a 37 °C, com DCFH₂-DA (35845, Sigma) de modo a obter a concentração final de 5 µM. A suspensão foi lavada com PBS e ressuspenso em 400 µL do mesmo. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo, utilizando um citómetro *FACSCalibur* (excitação e emissão nos comprimentos de onda de 504 e 529 nm, respectivamente). Foram adquiridos 10 000 eventos e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o *Paint-a-Gate 3.02*, *Machintosh Software*. Os dados obtidos foram analisados em termos da média das intensidades de fluorescência (MIF) (Sarkar, et al., 2005).

2.2.5.2.3. Avaliação da produção de $O_2^{\bullet-}$

A avaliação da produção de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), nas células incubadas na presença e na ausência das duas formas da vitamina C, foi efectuada por citometria de fluxo com recurso ao dihidroetídio (DHE). O DHE atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídeo (Figura 10), composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no ADN, permanecendo no interior da célula. Esta reacção é relativamente específica para o $O_2^{\bullet-}$, com oxidação mínima pelo H_2O_2 , $ONOO^-$ ou ácido hipocloroso (HOCl) (Zhao, et al., 2005).

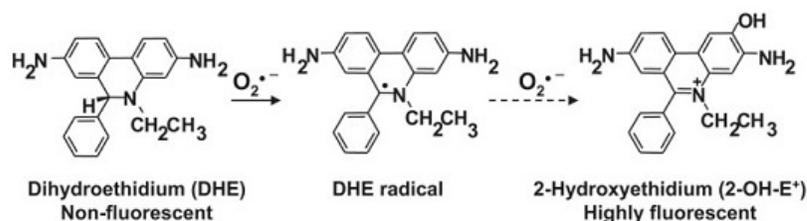


Figura 10 - Reacção de formação do composto fluorescente etídeo a partir da reacção do DHE com o radical superóxido.

Tal como na marcação com DCF, utilizaram-se 10^6 células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 300 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado uma vez com PBS. De seguida, o sedimento foi ressuspenso em 1000 μ L de PBS, adicionou-se DHE (Sigma) na concentração final de 5 μ M e incubou-se, durante 10 minutos a 37 $^{\circ}$ C. Após a incubação, a suspensão foi lavada com PBS e ressuspenso em 400 μ L do mesmo tampão. A detecção foi efectuada pelo mesmo procedimento e usando o mesmo equipamento, descritos anteriormente para a marcação com DCF e DHE, contudo, utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm (Budd, et al., 1997).

2.2.5.2.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado usando uma sonda fluorescente, o *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide* (JC-1). O potencial de membrana mitocondrial determina a captação selectiva do JC-1 pela mitocôndria. O JC-1 é um catião lipofílico, que existe em duas formas, monómeros (M) e agregados (A), consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência a comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana é elevado, forma agregados que emitem fluorescência vermelha (590 nm). Por sua vez, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana se encontra despolarizada, o JC-1 é excluído da mitocôndria e mantêm-se no citoplasma sob a forma de monómeros, que emitem fluorescência verde (529 nm). Assim, a razão entre a fluorescência verde e vermelha (M/A), determinada por citometria de fluxo, fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (Yao, et al., 2008).

Na marcação com JC-1, efectuou-se o mesmo procedimento descrito para o DHE, tendo as células sido incubadas com a concentração final de 5 mg/mL de JC-1 (Invitrogen, USA) durante 15 min, a 37 °C. Posteriormente, a suspensão foi novamente lavada com PBS e ressuspensa em 400 µL do mesmo tampão. A detecção foi efectuada pelo mesmo procedimento e usando o mesmo equipamento, descritos anteriormente para a marcação com DCF, contudo, utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Os resultados obtidos são expressos como média das intensidades de fluorescência (MIF) para os agregados (A) e para os monómeros (M), tendo-se calculado posteriormente a razão M/A (Yao, et al., 2008).

2.3. Estudos *in vivo*

Com o objectivo de esclarecer alguns dos resultados obtidos no controlo de qualidade do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, foram realizados estudos *in vivo* utilizando ratinhos *Balb/c nu/nu*. A escolha destes animais justifica-se pelo facto de serem animais que possuem vesícula biliar, dado importante para a obtenção de informação sobre a biodistribuição do composto.

Estes estudos permitiram também inferir acerca das vias de metabolização e excreção, assim como, dos órgãos-alvo do radiofármaco em questão.

2.3.1. Estudos de Biodistribuição com $^{99m}\text{Tc-AA}$

Os ratinhos *Balb/c nu/nu* normais foram primeiramente anestesiados com uma solução de ketamina (77 %) e clorpromazina (23 %) (ketamina, Ketalar®, Porke-Davis e clorpromazina, Largactil®, Laboratórios Vitória), administrada por via subcutânea. Posteriormente, para proceder aos estudos de biodistribuição, foi-lhes administrada uma actividade de cerca de 3,256 e 4,366 MBq (correspondente a 43907798 e 58876366 CPM, conversão necessária para cálculos posteriores) por injeção intravenosa (i.v.) na veia dorsal da cauda, sobre o colimador de uma câmara-gama.

Após a realização do experimento, os ratinhos foram sacrificados por deslocamento cervical, de acordo com a legislação em vigor. O sacrifício dos animais foi efectuado 30 e 60 minutos depois da injeção do $^{99m}\text{Tc-AA}$, tempos nos quais foram realizadas as autópsias dos mesmos. Foi, então, feita a colheita de vários órgãos,

nomeadamente, fígado, baço, pulmão, coração, intestino delgado, intestino grosso, tiróide, cérebro, cerebelo, bexiga, genitais, estômago, rim e vesícula biliar. Da mesma forma foram colhidos alguns tecidos, tais como, sangue, osso, cartilagem e músculo, assim como, fluidos de excreção, bÍlis e urina. Cada um dos órgãos, tecidos ou fluidos foi colocado num tubo de RIA, previamente pesado. Cada tubo, agora com o respectivo conteúdo da autópsia, foi pesado (em gramas) e posteriormente contado num contador de poço para quantificação da actividade presente (em CPM).

$$\% \text{ Dose injectada/grama} = \frac{\text{CPM}_{\text{totais do órgão}} / \text{massa}_{\text{órgão}}}{\text{CPM}_{\text{actividade total administrada}}} \times 100 \quad (6)$$

Tornou-se então possível a determinação da percentagem de dose de radiofármaco $^{99m}\text{Tc-AA}$ injectado/grama de órgão, tecido ou fluido. Este cálculo é traduzido na expressão (6).

2.3.2. Imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$

Os estudos de imagiologia nuclear incluíram a aquisição de imagens dinâmicas e estáticas. A aquisição dinâmica foi concretizada para assegurar a entrada do radiofármaco. As características das aquisições, dinâmica e estática, estão sumariadas no Quadro 1. Ambas foram feitas usando uma câmara-gama (GE 400 AC) controlada por um computador de aquisição *GenieAcq* e incorporando um colimador paralelo de baixa energia e alta resolução (LEHR – *low energy and high resolution*).

Quadro 1 - Características das aquisições dinâmicas e estáticas.

Característica	Aquisição Dinâmica	Aquisição estática
Nº Imagens	25	-
Duração Individual (seg)	450	60
Matrizes (pixels)	128x128	128x128
Zoom	1,7	1,7
Colimador	LEHR	LEHR

Dois ratinhos *Balb/c nu/nu* foram anestesiados, segundo o protocolo supramencionado nos estudos de biodistribuição. Imediatamente após a injeção de 3,256 e 4,366 MBq de $^{99m}\text{Tc-AA}$ na veia dorsal da cauda de cada um dos animais, iniciou-se a aquisição dinâmica, com o intuito de confirmar a entrada do radiofármaco. Após a aquisição das imagens dinâmicas, procedeu-se à aquisição das imagens estáticas dos ratinhos 1 e 2, aos 15 e 30 minutos e aos 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, após a administração do radiofármaco $^{99m}\text{Tc-AA}$.

Depois de adquiridas as imagens estáticas, estas foram transferidas para uma estação de trabalho *Xeleris*, para posterior processamento e análise. Para o processamento das imagens estáticas desenharam-se regiões de interesse (ROIs) para os vários órgãos, nomeadamente, tiróide, estômago, fígado, rim, bexiga. As ROIs foram desenhadas em órgãos a partir dos quais se poderia obter informação sobre a existência de impurezas radioquímicas, presentes no radiofármaco. Sabendo-se que normalmente a acumulação de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ se dá ao nível da tiróide e estômago, e que, por sua vez, a acumulação de $^{99m}\text{Tc-RH}$ se verifica ao nível do fígado e baço, tornou-se possível inferir e comprovar os valores de pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-AA}$ obtidos por

HPLC. Por outro lado, ROIs foram também desenhadas em zonas de maior actividade, para permitir a análise das vias de metabolização e excreção do complexo injectado.

2.4. Análise Estatística

Para aumentar o rigor da interpretação dos resultados obtidos, através dos procedimentos anteriormente descritos, fizemos a análise estatística dos mesmos. Para tal, utilizámos uma aplicação de tratamento estatístico de dados, o SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 16.

Em todos os estudos foram utilizados testes não paramétricos, visto que as amostras de dados são reduzidas e não seguem uma distribuição normal. Em casos em que se pretendia fazer a comparação de valores emparelhados, isto é, por exemplo duas variáveis (p.ex. AA e DHA) ao longo do tempo, utilizámos o teste de *Wilcoxon*. Por outro lado, usámos o teste de *Mann-Whitney* para comparar duas amostras independentes (p.ex. uma determinada concentração com o controlo) dentro da mesma variável (p.ex. tempo).

Capítulo III

Resultados

Os procedimentos anteriormente descritos permitiram a obtenção de resultados que constituem uma mais-valia no estudo do potencial terapêutico da vitamina C. O presente capítulo apresentará os resultados obtidos na formulação e controlo de qualidade do radiofármaco desenvolvido, nos estudos *in vitro* na linha celular de adenocarcinoma do cólon e com as duas formas da vitamina C, AA e DHA, nomeadamente, estudos de captação, estabilidade e citotoxicidade, e nos estudos *in vivo* como a biodistribuição e imagiologia com o $^{99m}\text{Tc-AA}$.

3.1. Estudos de química

3.1.1. Preparação e controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$

Após várias tentativas no sentido de otimizar o processo de marcação, a eficiência de marcação atingiu o seu máximo com a seguinte constituição da formulação farmacêutica desenvolvida: 296-370 MBq de pertecnetato (em 3 mL de NaCl 0,9 %), 0,2 mL de FeCl_3 0,1 N (em HCl 0,1 N), 200 mg de AA, pH acertado a 6,5 (com solução de NaOH 1 M), temperatura de 0 °C durante no mínimo 3 horas, e a formulação continuamente mantida em atmosfera de árgon e protegida da luz.

3.1.1.1. HPLC

Após marcação, avaliou-se a pureza radioquímica por HPLC, tendo-se determinado as impurezas radioquímicas. Esta determinação implicou a detecção prévia das amostras não-radioactivas de AA e FeCl_3 (Gráfico 1 e Gráfico 2) que, sendo detectadas por UV, não estão presentes no complexo marcado. Paralelamente,

efectuou-se, também, a avaliação prévia dos cromatogramas de amostras de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ (detecção por radioactividade), cujo tempo de retenção se verificou ser aproximadamente aos 3,4 minutos ($3,4 \pm 0,22$ min), como apresentado no Gráfico 3 e na Tabela 1.

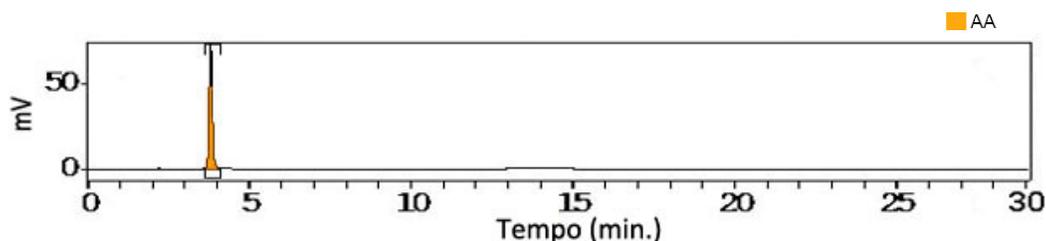


Gráfico 1 – Cromatograma do AA. A amostra de AA (10 mM) frio foi injectada no HPLC, e determinado o respectivo tempo de retenção por integração gráfica.

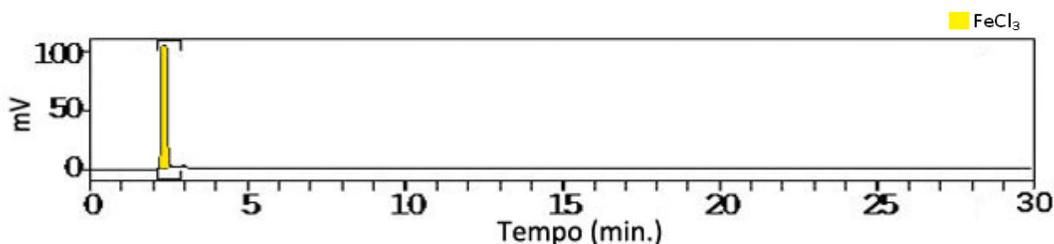


Gráfico 2 - Cromatograma do FeCl₃. A amostra de FeCl₃ (0,1 N) frio foi injectada no HPLC, e determinado o respectivo tempo de retenção por integração gráfica.

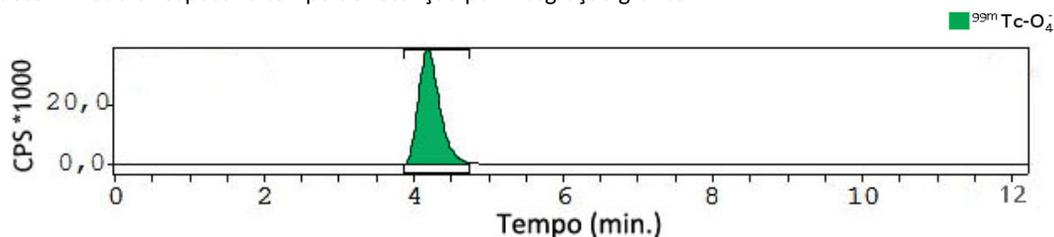


Gráfico 3 - Cromatograma do $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$. A amostra de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ foi injectada no HPLC, e determinado o respectivo tempo de retenção por integração gráfica.

De referir que não foi injectada a amostra de $^{99m}\text{Tc-RH}$, contudo, os compostos hidrofóbicos são os últimos a ser detectados; consequentemente, o $^{99m}\text{Tc-RH}$, por exclusão de partes, será o último pico do cromatograma.

Com estes estudos obtiveram-se os respectivos tempos de retenção evidenciados nos Gráfico 1,Gráfico 2 eGráfico 3 e que estão sumariados na Tabela 3. Os

valores apresentados na tabela representam a média, com $n=3$, de três *kits* escolhidos aleatoriamente.

Tabela 3 - Tempos de retenção referentes ao controlo de qualidade determinados por HPLC.

Composto	Tempo de retenção (min)	Tipo de detecção
FeCl ₃	2,41 ± 0,03	UV
AA	3,40 ± 0,22	UV
^{99m} Tc-AA	2,69 ± 0,03	Radioactividade
^{99m} Tc-O ₄ ⁻	3,88 ± 0,23	Radioactividade
^{99m} Tc-RH	5,76 ± 0,49	Radioactividade

Baseado nos dados da tabela foi então possível determinar a eficiência de marcação dos diferentes complexos.

O Gráfico 4 representa um cromatograma obtido a partir da detecção por radioactividade de uma formulação com reduzida eficiência de marcação (54,75 %). A partir deste, podem-se observar claramente os tempos de retenção dos diferentes compostos radioactivos presentes no complexo, distinguindo-se o ^{99m}Tc-AA, ^{99m}Tc-O₄⁻ e o ^{99m}Tc-RH. Desta forma, considerar-se-á este cromatograma como ponto de comparação para os restantes, obtidos por detecção por radioactividade, apresentados.

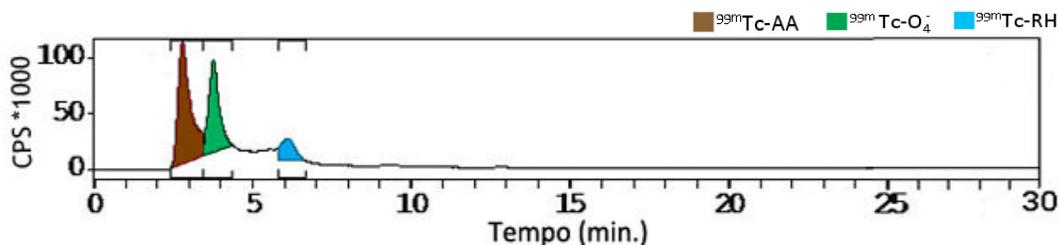


Gráfico 4 – Cromatograma da formulação 55. O controlo de qualidade da formulação 55 foi realizado, por HPLC, 30 minutos após a adição de ligando, tendo sido obtido o cromatograma evidenciado, o qual expressa reduzida eficiência de marcação (54,75 %).

O Gráfico 5 apresenta o cromatograma de um kit com elevada eficiência de marcação (98,37 %). Os compostos não-radioactivos (deteccção UV) e os radioactivos (deteccção por radioactividade) estão representados nos Gráfico 5-A e Gráfico 5-B.

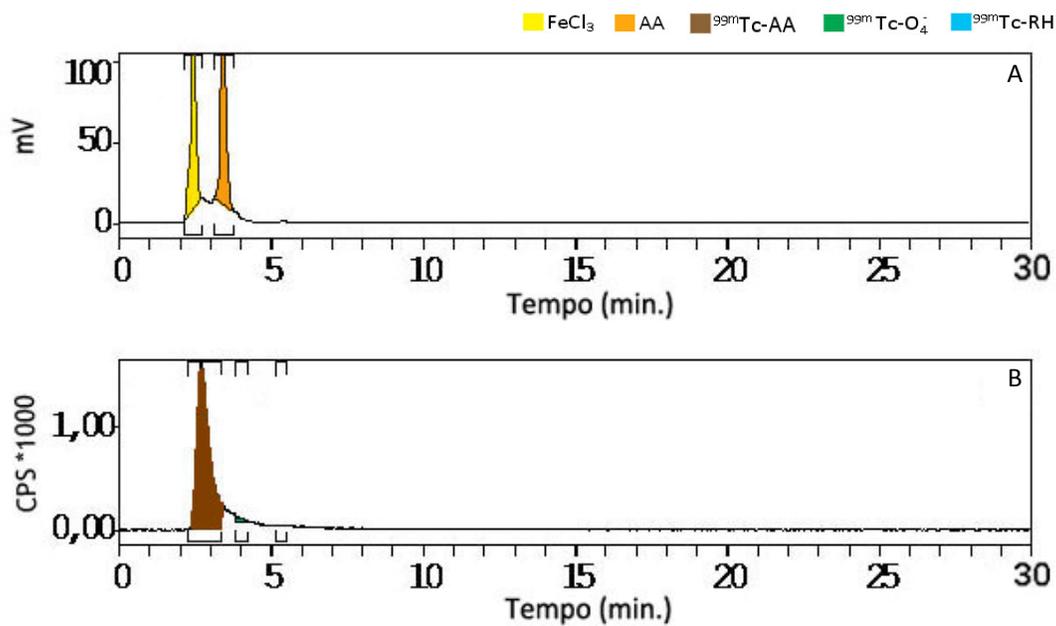


Gráfico 5 - Cromatograma da formulação 54. O controlo de qualidade da formulação 55 foi realizado, por HPLC, 24 horas após a adição de ligando, tendo sido obtido o cromatograma evidenciado, o qual expressa elevada eficiência de marcação (98,37 %).

O Gráfico 6 representa as eficiências de marcação de algumas formulações marcadas.

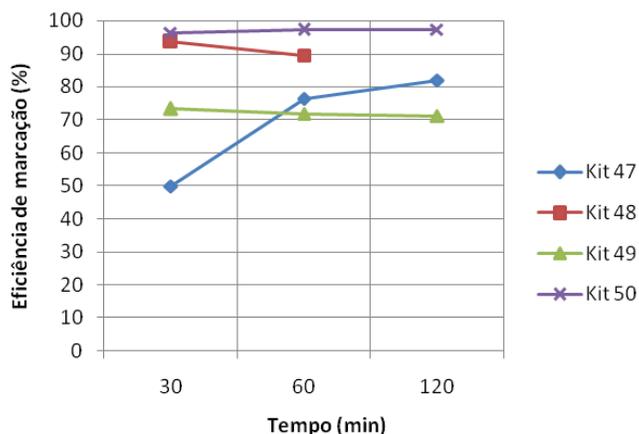


Gráfico 6 – Análise das eficiências de marcação de algumas formulações ao longo do tempo. O controlo de qualidade das formulações 47, 48, 49 e 50 foi realizado, por HPLC, nos tempos indicados no gráfico e as respectivas eficiências de marcação, posteriormente, determinadas.

Da análise dos diversos resultados obtidos, podemos verificar que, mesmo as formulações cuja eficiência de marcação era inicialmente reduzida, 24 h após a adição de ligando, se obtinham eficiências de marcação bastante elevadas (Gráfico 7). Este dado permite aferir que as reacções que dão origem ao complexo são lentas.

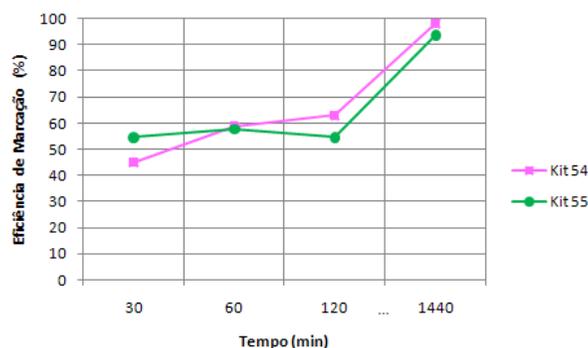


Gráfico 7- Análise das eficiências de marcação de algumas formulações ao longo do tempo. O controlo de qualidade das formulações 54 e 55 foi realizado, por HPLC, 24 horas após a adição de ligando, e as respectivas eficiências de marcação, posteriormente, determinadas.

3.1.1.2. Microcromatografia ascendente

Após optimização da eficiência de marcação, visto poder ser controlada por HPLC, tentámos desenvolver um método rápido de avaliação da pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-AA}$, tendo por base a microcromatografia ascendente. Como, basicamente, podem coexistir dois contaminantes, tais como, o $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ e o $^{99m}\text{Tc-RH}$, associados ao complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, a nossa ideia foi arranjar um conjunto de dois sistemas complementares. Um permitiria isolar o $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ dos restantes compostos, usando um solvente orgânico como fase móvel, enquanto o segundo sistema isolaria o $^{99m}\text{Tc-RH}$, usando como fase móvel o soro fisiológico ou água desionizada. Dos múltiplos sistemas usados, usando diferentes fases estacionárias e diferentes fases móveis, nunca conseguimos obter resultados concordantes com a avaliação realizada por

HPLC. Desta forma, foi dada prioridade ao controlo de qualidade por HPLC, visto que este se baseia em métodos de maior rigor e precisão. Fica em aberto a necessidade de optimização dos sistemas de microcromatografia ascendente por nós desenvolvidos, de modo a haver um método rápido, barato e eficiente de realizar o controlo de qualidade do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$.

3.2. Estudos *in vitro*

Realizámos estudos *in vitro* com células de adenocarcinoma do cólon, os quais permitiram obter resultados sobre o influxo da vitamina C, através dos estudos de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e dos estudos de HPLC, assim como, sobre a citotoxicidade das duas formas da vitamina C, AA e DHA, recorrendo a estudos de proliferação celular e à citometria de fluxo. Cada estudo realizado foi normalizado para o mesmo número de células.

3.2.1. Estudos de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$

Nos estudos de captação efectuados, primeiramente, comparámos a percentagem de captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ para duas concentrações diferentes, 0,925 MBq/mL e 1,850 MBq/mL (Gráfico 8).

Pelos resultados evidenciados no Gráfico 8 e no Quadro 2, a percentagem de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ é menor para concentrações mais elevadas, contudo, este aumento apenas é estatisticamente significativo aos 15, 30 e 45 minutos ($p < 0,05$). Para ambas as concentrações observa-se uma tendência crescente na captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo do tempo.

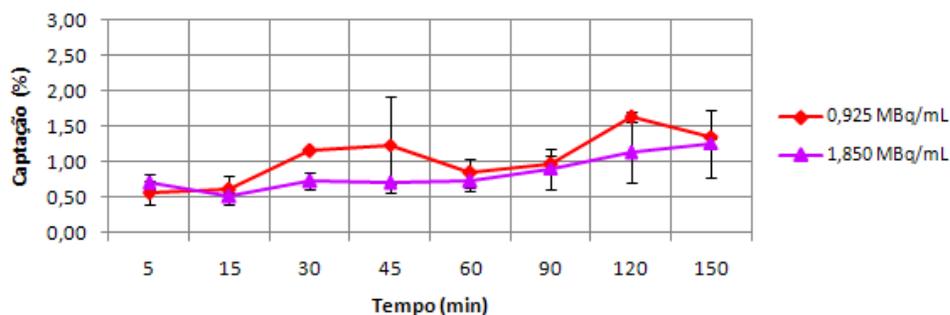


Gráfico 8 – Análise da captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo do tempo. As células WiDr foram incubadas com diferentes concentrações de $^{99m}\text{Tc-AA}$, 0,925 e 1,850 MBq/mL, e determinada a captação do complexo marcado por estudos de influxo. Os dados expressam a média de seis experiências independentes.

Quadro 2 - Análise da variância da captação das duas concentrações de $^{99m}\text{Tc-AA}$ em cada instante.

Tempo (min)	5	15	30	45	60	90	120	150
U	35,000	14,000	13,000	8,000	24,000	22,000	22,000	23,000
Z	-0,094	-2,060	-2,154	-2,622	-1,124	-1,311	-1,311	-1,218
p	0,964	0,041	0,032	0,007	0,291	0,213	0,213	0,250

Para além disso, foi também comparada a captação de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ com a do radiofármaco, na mesma concentração (0,925 MBq/mL). Os resultados são apresentados no Gráfico 9 e no Quadro 3, e demonstram alterações significativas entre os 60 e os 90 minutos, sendo a captação do $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$, neste período de tempo, superior à do $^{99m}\text{Tc-AA}$ ($p < 0,05$). Nos restantes tempos não se verificam diferenças significativas, observando-se, no entanto, que a captação do $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ é maioritariamente superior à do radiofármaco.

Citotoxicidade Selectiva da Vitamina C

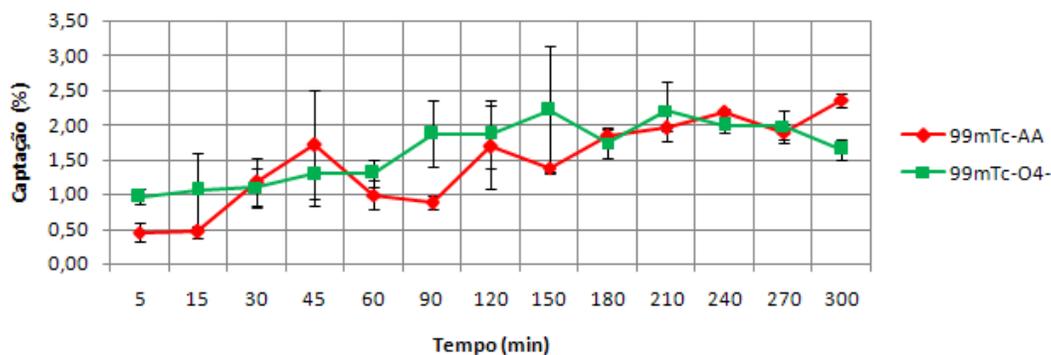


Gráfico 9 - Análise da captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao longo do tempo. As células WiDr foram incubadas com a mesma concentração de $^{99m}\text{Tc-AA}$ e $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$. Posteriormente, foi determinada a captação dos compostos radioactivos por estudos de influxo. Os dados expressam a média de três duplicados.

Quadro 3 - Análise da variância da captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ e de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ em cada instante.

Tempo (min)	5	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300
U	5,00	11,00	16,00	13,00	3,00	0,00	11,00	5,00	12,00	10,00	8,00	3,00	0,00
Z	-1,876	-1,010	-0,289	-0,722	-2,165	-2,598	-1,010	-1,876	-0,277	-0,647	-1,017	-0,655	-1,732
p	0,070	0,365	0,840	0,536	0,031	0,004	0,365	0,070	0,864	0,600	0,373	0,700	0,200

3.2.2. Estudos de estabilidade da vitamina C

Os resultados obtidos a partir dos estudos por detecção UV de HPLC permitem compreender o influxo das duas formas da vitamina C, AA e DHA, e dessa forma estudar a sua estabilidade nas culturas celulares de adenocarcinoma do cólon.

De referir que, a análise dos cromatogramas foi efectuada pela comparação dos diferentes compostos presentes numa mesma amostra e pela comparação da quantidade de um composto em amostras sujeitas a diferentes condições. A primeira foi possível pela determinação dos tempos de retenção, que são específicos de cada substância, e a segunda pela quantificação das áreas de integração de diferentes cromatogramas.

Primeiramente, foram injectadas amostras individuais, fora do ambiente celular, de DMEM (meio), de AA e de DHA, para se averiguarem os respectivos tempos de retenção. As duas formas da vitamina C foram injectadas com a mesma concentração, isto é, de 10 mM. Os resultados obtidos estão evidenciados no Gráfico 10.

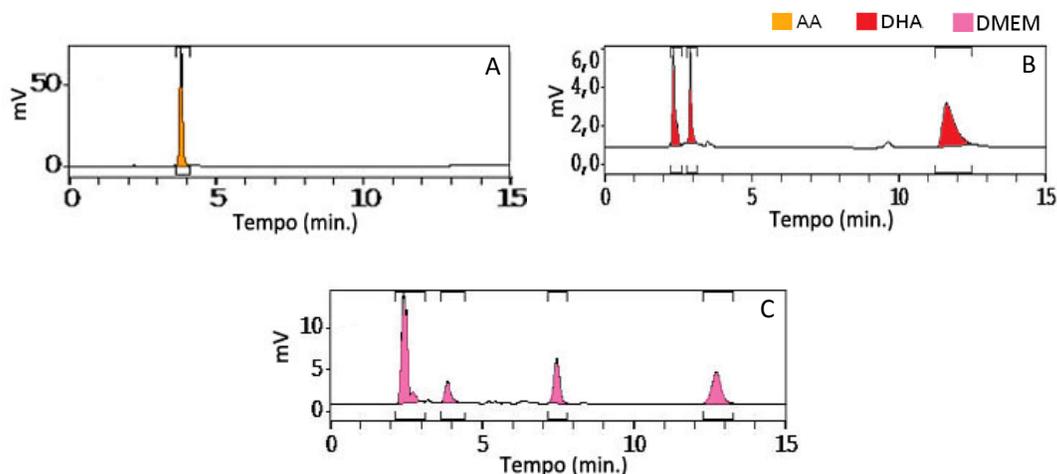


Gráfico 10 - Cromatogramas das amostras de AA (A), DHA (B) e DMEM (C). Amostras de AA 10 mM, DHA 10 mM e DMEM foram injectadas no HPLC e, posteriormente, determinado(s) o(s) respectivo(s) tempo(s) de retenção por integração gráfica.

O tempo de retenção do AA é $3,4 \pm 0,22$, valor já determinado anteriormente no controlo de qualidade do $^{99m}\text{Tc-AA}$ (Gráfico 1). Por sua vez, os cromatogramas referentes a DMEM e DHA, demonstram não só um pico de detecção mas sim vários, indicando que são compostos por diferentes substâncias. O meio para cultura celular é constituído por vários compostos diferentes pois têm que ser capazes de fornecer às células os nutrientes que estas necessitam. Por sua vez, o DHA é um composto cujas propriedades ainda não foram exploradas na sua totalidade, o que pode estar na origem do cromatograma obtido. Contudo, visto que a análise por HPLC é feita por comparação, este facto não afecta a análise dos resultados obtidos e, por isso mesmo, não foram averiguadas individualmente as substâncias correspondentes a cada pico de

DMEM e DHA. Consequentemente, identificaram-se os tempos de retenção de cada um dos picos, de DMEM e de DHA, como DMEM 1, DMEM 2, ..., e DHA 1, DHA 2, etc, respectivamente. A Tabela 4 apresenta os tempos de retenção determinados.

Tabela 4 – Média dos tempos de retenção (com n=3) referentes às amostras de AA, DHA e DMEM analisadas por HPLC.

Composto	Tempo de retenção (min)	Tipo de detecção
AA	3,55±0,22	UV
DHA 1	2,34 ± 0,01	UV
DHA 2	2,91 ± 0,01	UV
DHA 3	11,52 ± 0,11	UV
DMEM 1	2,47 ± 0,64	UV
DMEM 2	4,04 ± 0,19	UV
DMEM 3	8,56 ± 0,97	UV
DMEM 4	14,70 ± 1,72	UV

Tornou-se também necessário averiguar qual o efeito do pH nas reacções das duas formas da vitamina C, isto é, quais as possibilidades de que o pH do meio pudesse ser suficiente para a oxidação do AA em DHA ou para a redução do DHA em AA. Para tal, foram feitas incubações durante 1 e 72 horas com DMEM e AA e com DMEM e DHA, cujos resultados obtidos estão manifestos nos Gráfico 11e no Gráfico 12.

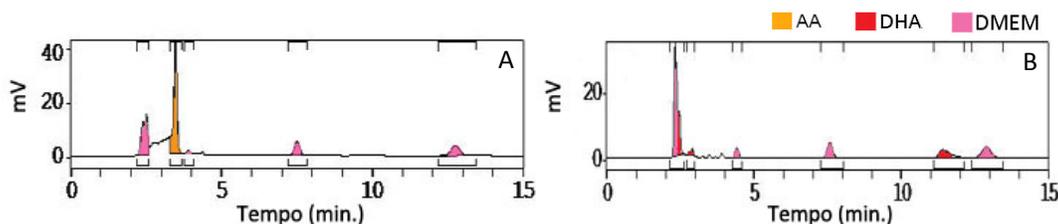


Gráfico 11 – Análise do efeito do pH nas duas formas da vitamina C. Foi incubado DMEM com AA 10 mM (A) e DMEM com DHA 10 mM (B), durante 1 h. Uma amostra de cada incubação foi injectada no HPLC e, posteriormente, analisados os tempos de retenção e áreas por integração gráfica.

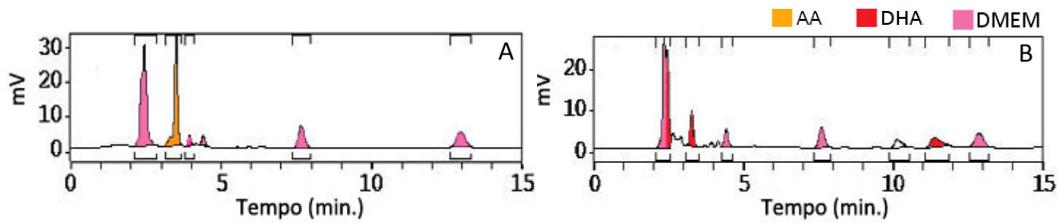


Gráfico 12 - Análise do efeito do pH nas duas formas da vitamina C. Foi incubado DMEM com AA 10 mM (A) e DMEM com DHA 10 mM (B), durante 72 h. Uma amostra de cada incubação foi injectada no HPLC e, posteriormente, analisados os tempos de retenção e áreas por integração gráfica.

Primeiramente, é importante realçar que foi analisado individualmente o meio celular após 72 h de incubação, e comparado com o cromatograma referente à 1 h de incubação (Gráfico 10-C), não se verificando alterações significativas nos tempos de retenção e respectivas áreas de integração. Desta forma, é admissível comparar os cromatogramas de amostras referentes a diferentes tempos de exposição.

Comparados os tempos de retenção obtidos com os dados da Tabela 4, verifica-se que, em ambos os tempos de exposição, na incubação com AA não se forma DHA. Da mesma forma, na incubação com DHA não se observa qualquer pico semelhante ao AA e, por isso, não há redução do DHA em AA.

3.2.2.1. Avaliação do meio extracelular

Para avaliar a estabilidade da vitamina C nas células e, indirectamente, os mecanismos de transporte da mesma, foram realizados estudos por HPLC. Estes estudos visam a avaliação dos compostos presentes no meio extracelular. Os resultados obtidos estão evidenciados nos Gráfico 13 e Gráfico 15 referentes à incubação com AA e DHA, respectivamente.

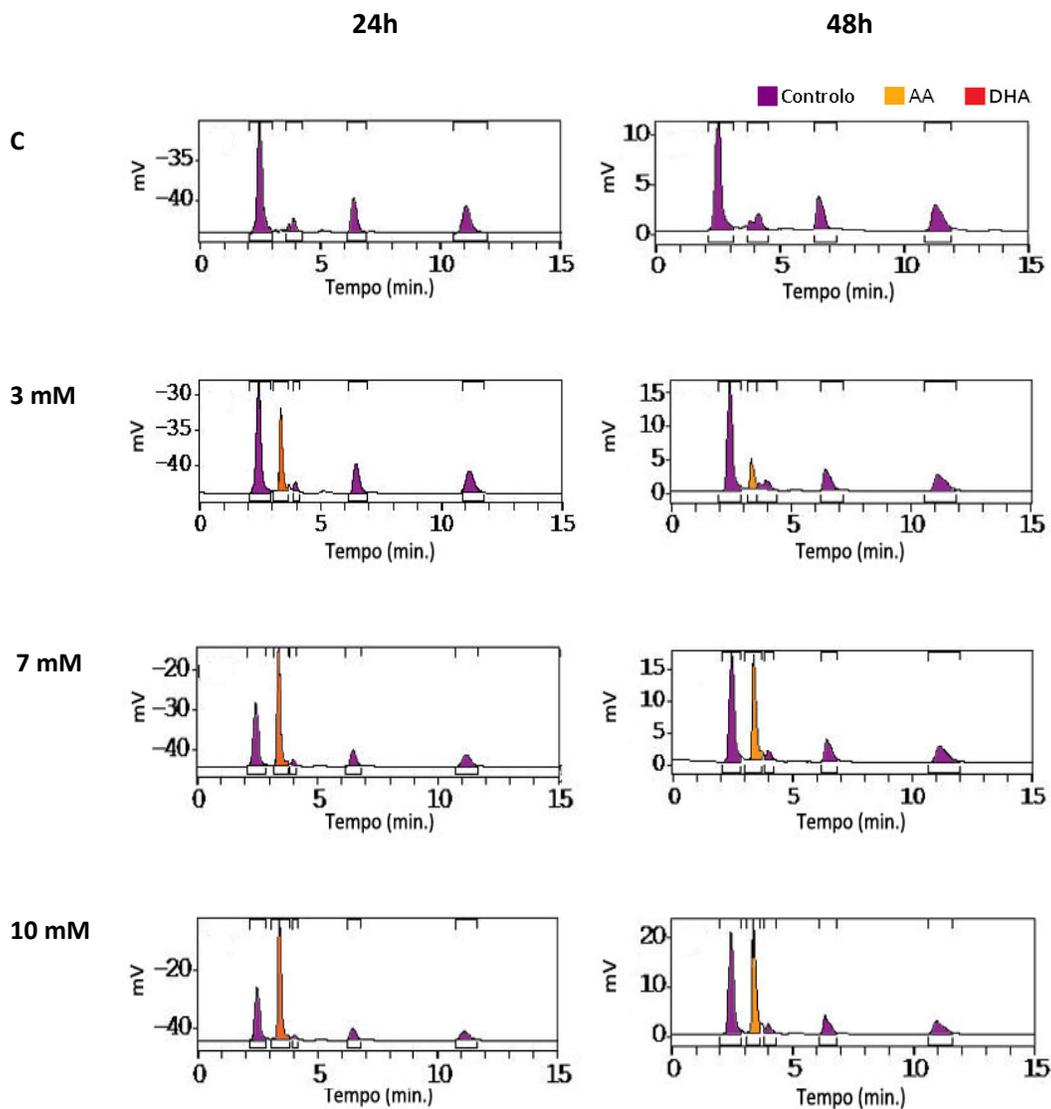


Gráfico 13 - Estudo comparativo para avaliação do meio extracelular após incubação com AA. As células WiDr foram tratadas, durante 24 e 48 h, na ausência (C) e na presença de AA, em diferentes concentrações referidas no gráfico. Foram injectadas amostras de cada uma no HPLC e comparados os tempos de retenção e respectivas áreas por integração gráfica.

Primeiramente, foi necessário identificar os tempos de retenção da amostra controlo, tendo-se obtido os valores evidenciados na Tabela 5.

Tabela 5 - Média dos tempos de retenção (com n=3) referentes à amostra controlo analisada por HPLC.

Composto	Tempo de retenção (min)	Tipo de detecção
C1	2,49+0,03	UV
C2	3,89+0,26	UV
C3	6,43+0,10	UV
C4	11,11+0,12	UV

A observação dos gráficos permite aferir que, independentemente da concentração de AA e do período de incubação, o pico do AA é detectado por volta dos 3,33 minutos. Contudo, é de referir que, a área de integração da amostra de AA (10 mM), representada no Gráfico 1, é 460,03 mV*s. Por sua vez, a mesma concentração de AA (10 mM), no ambiente celular, origina um pico referente ao AA de áreas 388,65 e 175,37 mV*s, para as 24 e 48 h de incubação, respectivamente. Tendo em conta que, na análise por HPLC, o volume de amostra injectado é sempre o mesmo (25 µL) em ambos os casos, podemos aferir que a quantidade de AA, com que são incubadas as células, é superior à quantidade que é detectada no meio extracelular.

Por outro lado, a partir desta análise directa dos cromatogramas, não se observam picos correspondentes ao DHA. Contudo, comparando os tempos de retenção do AA, do DHA e do controlo (Tabela 4 e Tabela 5) e tendo em conta que as áreas de integração da amostra de DHA são muito reduzidas, coloca-se a hipótese de que os picos de DHA possam estar sobrepostos e, conseqüentemente, não ser visíveis. Este facto pode, no entanto, ser averiguado pela análise dos valores das áreas de integração referentes a cada um dos picos do controlo (C1, C2, C3 e C4).

A partir da análise das Tabela 4 e Tabela 5 e pela posterior comparação dos tempos de retenção do DHA (DHA 1, DHA 2, DHA 3) e do controlo (C1, C2, C3 e C4), é possível perceber que, caso haja sobreposição de picos, esta será mais evidente nos

picos C1 e C4. Assim, um aumento significativo das áreas de integração do C1 e C4, poderá ser um indício da presença de DHA no meio extracelular.

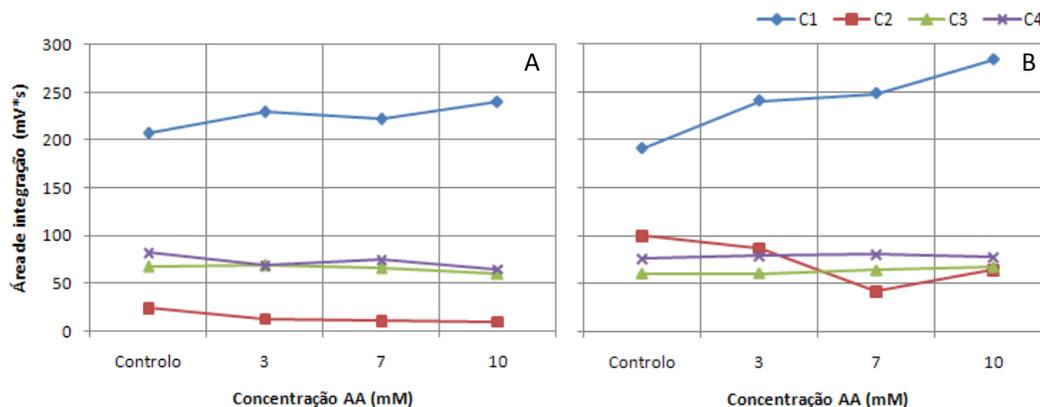


Gráfico 14 – Análise da presença de DHA no meio extracelular. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados no gráfico 13 compararam-se as áreas de integração dos picos da amostra controlo, para os cromatogramas obtidos 24 (A) e 48 (B) horas após incubação com AA, para as diferentes concentrações do mesmo.

O Gráfico 14 evidencia as áreas de integração dos picos C1, C2, C3 e C4 em função da concentração de AA. No Gráfico 14-A não se verificam alterações significativas. No Gráfico 14-B verifica-se um aumento da área de integração C1 que, no entanto, não é acompanhada pelo aumento da área C4, a qual se mantém constante. Consequentemente, poder-se-á inferir a inexistência de DHA no meio extracelular.

Os resultados obtidos após as incubações com DHA estão apresentados no Gráfico 15. A análise directa dos cromatogramas não evidencia qualquer existência de AA no meio extracelular em qualquer dos períodos de incubação, visto que não se observa nenhum pico correspondente ao tempo de retenção do AA (Gráfico 1). Quanto à existência de DHA, com o aumento da concentração verifica-se a presença de um pico com área de integração muito reduzida que poderá corresponder ao DHA 2. Para averiguar este facto, procedeu-se à análise das áreas de integração dos picos da amostra controlo, tal como foi feito anteriormente.

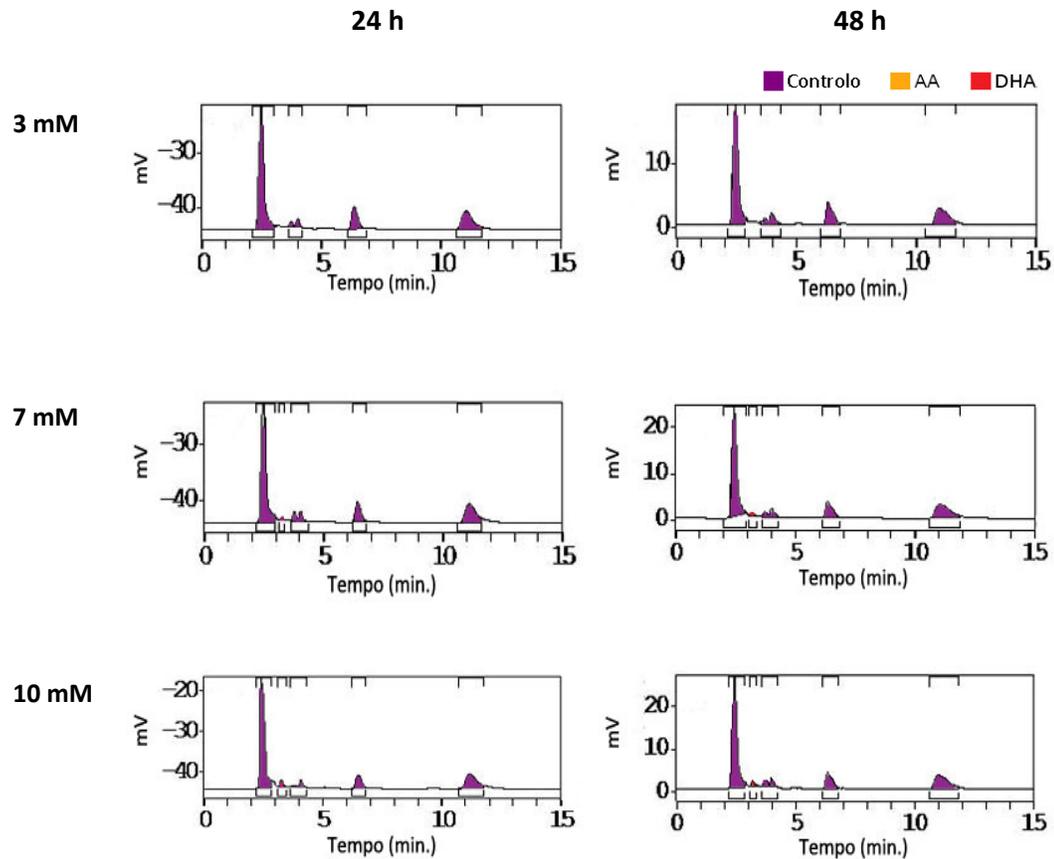


Gráfico 15 - Estudo comparativo para avaliação do meio extracelular após incubação com DHA. As células WiDr foram tratadas, durante 24 e 48 h, na ausência (C) (controlo evidenciado no gráfico 13) e na presença de DHA, em diferentes concentrações referidas no gráfico. Foram injectadas amostras de cada uma no HPLC e comparados os tempos de retenção e respectivas áreas por integração gráfica.

Os resultados da comparação das áreas de integração dos quatro picos da amostra controlo são apresentados no Gráfico 16. A partir deste verifica-se que, com o aumento da concentração de DHA, há um aumento acentuado da área C1 e um aumento ligeiro da área C4, tanto 24 como 48 h após incubação. Este facto pode comprovar a presença de DHA no meio extracelular, podendo ser significativa para incubações com concentrações elevadas de DHA.

Citotoxicidade Selectiva da Vitamina C

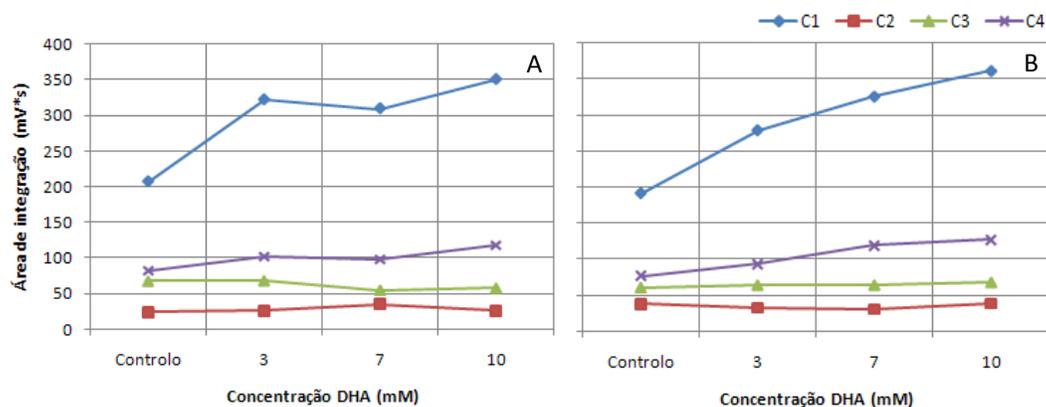


Gráfico 16 - Análise da presença de DHA no meio extracelular. Após integração gráfica dos cromatogramas evidenciados no gráfico 15 compararam-se as áreas de integração dos picos da amostra controlo, para os cromatogramas obtidos 24 (A) e 48 (B) horas após incubação com DHA, DHA, para as diferentes concentrações do mesmo.

De referir que foram efectuados estudos também para 72 horas de período de incubação. No entanto, os resultados foram semelhantes aos apresentados para as 24 e 48 horas, pelo que se torna desnecessária a sua apresentação.

3.2.3. Determinação da citotoxicidade da vitamina C

3.2.3.1. Avaliação da proliferação celular

Para avaliarmos os efeitos biológicos da vitamina C em células de adenocarcinoma do cólon em cultura, fomos analisar o efeito das duas formas da vitamina C, o AA e o DHA, em diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo, na proliferação das células, recorrendo ao método do MTT.

Os Gráfico 17 e Gráfico 18 representam as curvas dose-resposta do AA e do DHA, respectivamente. Ao controlo, que constitui o termo de comparação, foi atribuído o valor de 100 %.

Como se pode observar no Gráfico 17, o AA em baixas concentrações (inferiores a 0,5 mM) induz aumento da proliferação celular estatisticamente significativa às 72 e 96 h, atingindo valores de 30 a 40 % superiores relativamente ao controlo. Pelo contrário, para concentrações elevadas de AA (superiores a 7 mM), induz inibição da proliferação celular, de forma dependente da dose, atingindo o IC50 às 48 h quando as células são tratadas com AA na concentração de 10 mM ($p < 0,05$).

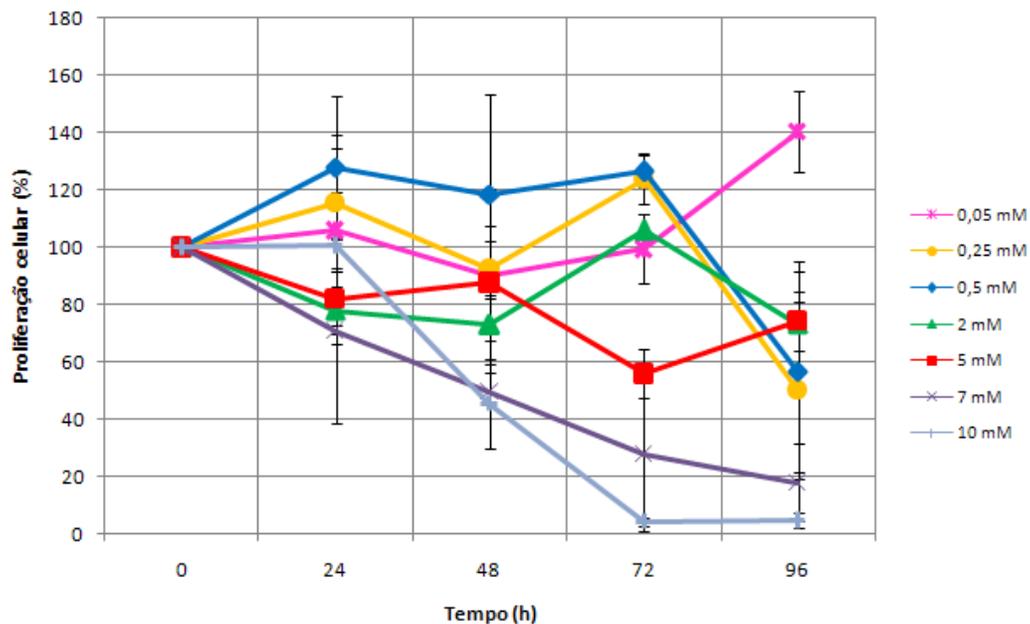


Gráfico 17 - Curvas dose-resposta do AA. Os gráficos representam o efeito do AA na proliferação das células de adenocarcinoma do cólon (WiDr), após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, nas concentrações referidas na figura. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes.

Quando as células foram tratadas com DHA, verificou-se um aumento significativo da proliferação celular para baixas concentrações deste composto, embora para concentrações superiores às obtidas para o AA, ou seja, aproximadamente de 0,25 a 0,5 mM. Por outro lado, o DHA induziu a diminuição da proliferação celular proporcional ao aumento da dose ($p < 0,05$), embora para concentrações muito inferiores às de AA utilizadas, uma vez que se atingiu 50 % da

proliferação celular (IC50) logo após as 24h de exposição das células a DHA 5-7 mM (Gráfico 18).

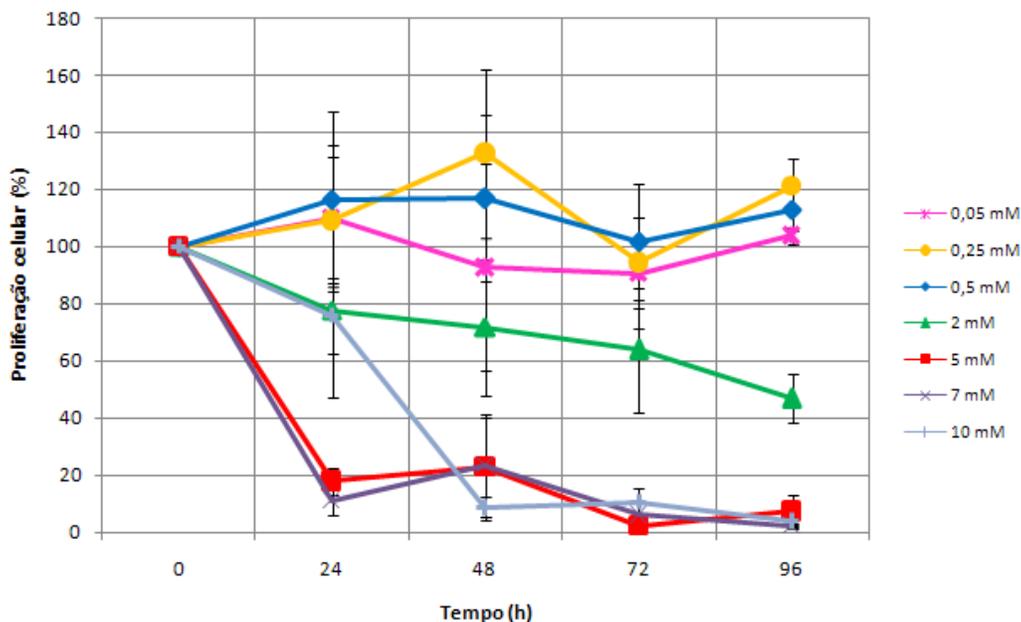


Gráfico 18 – Curvas dose-resposta do DHA. Os gráficos representam o efeito do DHA na proliferação das células de adenocarcinoma do cólon (WiDr), após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, nas concentrações referidas na figura. Os resultados expressam a média de seis experiências independentes.

Assim, é de salientar que, o DHA evidenciou um efeito antiproliferativo mais eficaz que o AA, visto que o IC50 é atingido mais precocemente e para concentrações mais baixas.

3.2.3.2. Avaliação da viabilidade e morte celular

A avaliação da viabilidade e morte celular foi realizada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (IP).

Como referido anteriormente, esta técnica permite-nos distinguir diferentes populações celulares: células viáveis (V), células em apoptose inicial (A), células em apoptose tardia e necrose (A/N) e células em necrose (N) (Gráfico 19).

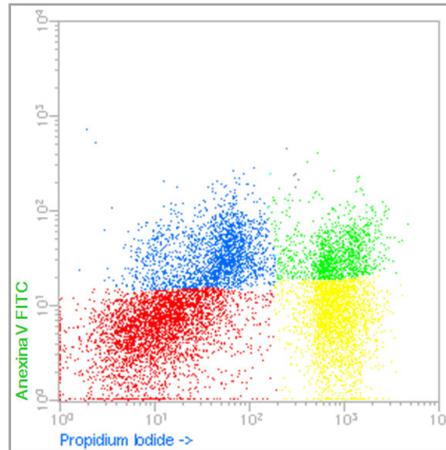


Gráfico 19 – Dot-plot representativo da marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (AV/IP). As células WiDr foram tratadas com 7 mM de DHA, durante 48 h, e marcadas com AV/IP e analisadas por citometria de fluxo. **Legenda de cores:** a vermelho - células viáveis; a azul - células em apoptose inicial; a verde - células em apoptose tardia e necrose; e a amarelo - células em necrose.

Os estudos de citometria vieram confirmar a inexistência de morte celular quando as células são tratadas com AA em concentrações inferiores a 2 mM, como se evidencia no Gráfico 20. Porém, na concentração de 7 mM, observa-se uma diminuição de 6,5 % de células viáveis, com aumento da percentagem de células em apoptose tardia/necrose. Pelo contrário, quando as células são incubadas com DHA, observa-se um efeito antiproliferativo e citotóxico mais acentuado. De facto, verificamos que o DHA induz diminuição da viabilidade de forma dependente da dose, induzindo morte celular por apoptose/necrose. Como podemos ver no Gráfico 20, o DHA, na concentração de 7 mM, reduz a viabilidade das células em aproximadamente 40 %,

relativamente ao controlo (C), aumentando simultaneamente a percentagem de células em apoptose tardia/necrose.

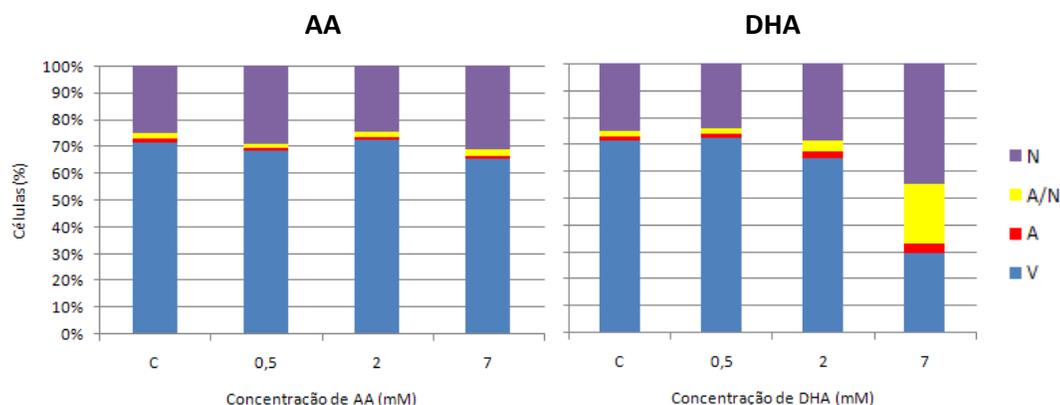


Gráfico 20 – Análise da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina-V e IP. Está representada a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (A), em apoptose/necrose (A/N) e em necrose (N), após 48 h de incubação com AA (esquerda) e DHA (direita). Os dados expressam a média de duas experiências independentes.

3.2.3.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade da vitamina C

Dada a importância que as ROS poderão ter nos mecanismos de citotoxicidade da vitamina C, determinámos a presença de peróxidos e radical superóxido nas células WiDr tratadas com as duas formas da vitamina C, usando as sondas DCFH₂-DA e a DHE, respectivamente.

Como já referimos na secção de métodos, a determinação de peróxidos é possível tendo em conta que o DCFH₂-DA entra na célula e, por acção de esterases, é clivado originando o DCFH, o qual na presença de peróxidos origina o composto fluorescente DCF. Quanto maior a produção de peróxidos, maior a intensidade de fluorescência desta molécula.

No Gráfico 21 observa-se um *dot-plot* representativo da análise da produção de peróxidos intracelulares, por citometria de fluxo, recorrendo à sonda fluorescente DCF.

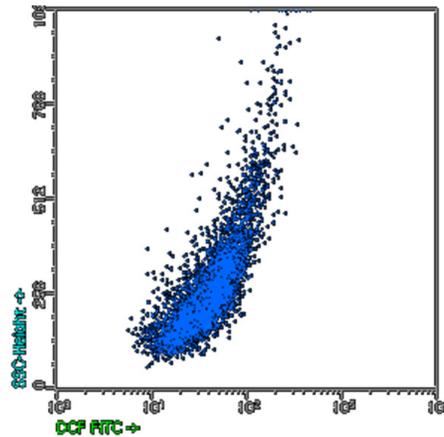


Gráfico 21 – *Dot-plot* representativo da análise de peróxidos intracelulares, após marcação com DCFH₂-DA. As células WiDr foram incubadas com DHA 7 mM, durante 48 h, marcadas com DCFH₂-DA e, posteriormente, analisadas por citometria de fluxo.

Como se pode observar no Gráfico 22, quando as células são tratadas com DHA em concentrações de 0,5 e 2 mM, observa-se um aumento de 36,1 % na produção de peróxidos, relativamente ao controlo. Pelo contrário, nas concentrações mais elevadas (5 mM), o efeito citotóxico foi mais acentuado, observando-se uma diminuição da produção de peróxidos intracelulares de 70,6 %.

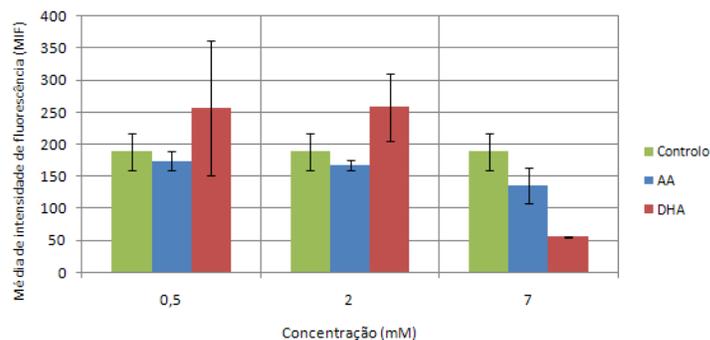


Gráfico 22 – Avaliação de peróxidos intracelulares por citometria de fluxo. As células WiDr foram tratadas com AA e DHA, durante 48 h, e a produção de peróxidos detectada, por citometria de fluxo, pela marcação com DCFH₂-DA. Os resultados são expressos em termos da média de intensidade de fluorescência (MIF) e expressam a média de duas experiências independentes.

Para avaliarmos a produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) recorreremos à marcação com DHE e à análise das intensidades de fluorescência por citometria de fluxo. A partir da análise dos Gráfico 23 e Gráfico 24 podemos verificar que, enquanto que as células tratadas com AA apresentam baixas concentrações de $O_2^{\bullet-}$ relativamente ao controlo, quando incubadas com DHA, uma tendência para o contrário é observada, embora sem significado estatístico.

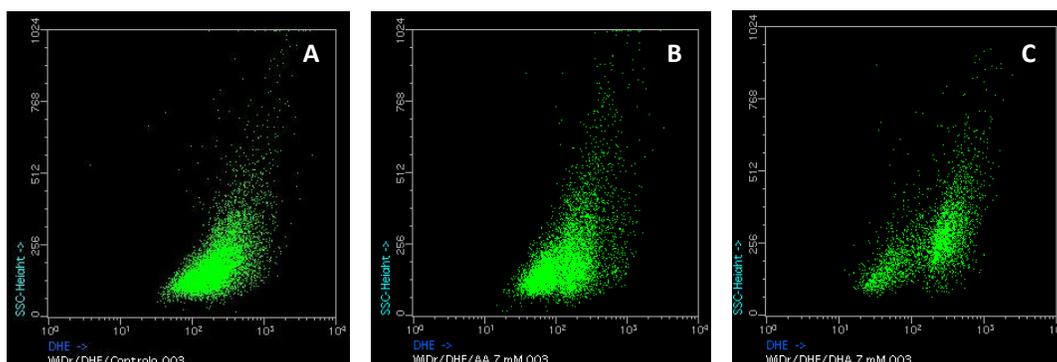


Gráfico 23 – Dot-plots representativos da produção de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), obtidos por citometria de fluxo. As células WiDr foram tratadas, durante 48 h, na ausência (controlo – A), e na presença de AA 7 mM (B) e de DHA 7 mM (C). Posteriormente, foram marcadas com DHE e analisadas por citometria de fluxo.

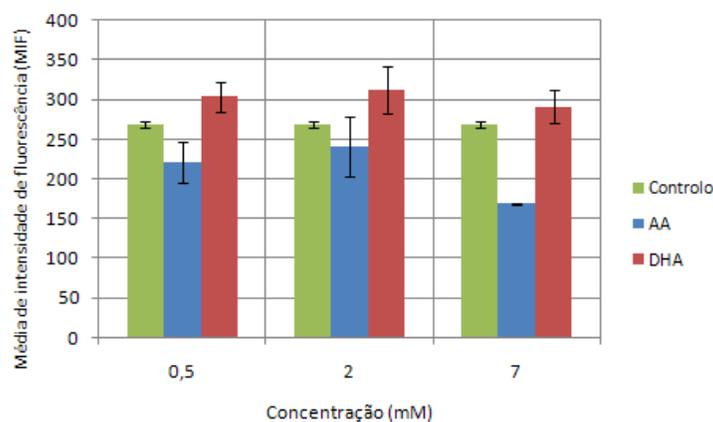


Gráfico 24 – Análise da produção de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por citometria de fluxo. As células WiDr foram tratadas com AA e DHA, durante 48 h, nas concentrações indicadas no gráfico. Posteriormente, foram marcadas com DHE e o $O_2^{\bullet-}$ detectado por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média de duas experiências independentes.

3.2.3.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliarmos a participação da mitocôndria nos efeitos biológicos da vitamina C, fomos avaliar o potencial de membrana mitocondrial, recorrendo à sonda fluorescente JC-1 (Gráfico 25). Este fluorocromo é um catião lipofílico que entra selectivamente na mitocôndria. Este existe na forma de monómeros (M) (fluorescência verde), e na forma de agregados (A) (fluorescência vermelha), dependendo do potencial de membrana mitocondrial. Assim, é emitida fluorescência que muda do vermelho para o verde, quando as mitocôndrias despolarizam, ou seja, quando diminui o potencial de membrana mitocondrial.

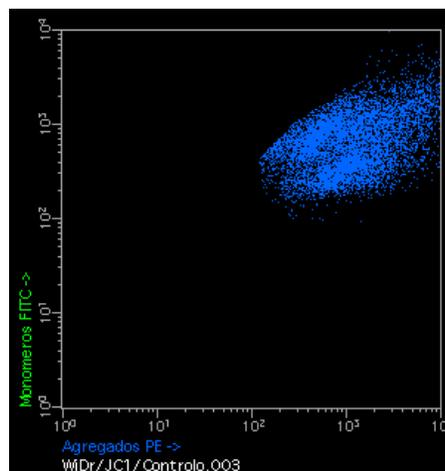


Gráfico 25 – Dot-plot representativo da análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. As células foram incubadas na ausência de AA e DHA, marcadas com JC-1 e analisadas por citometria de fluxo.

O Gráfico 26 mostra a razão M/A nas células WiDr tratadas com AA e DHA. Como podemos observar, ocorre um aumento significativo da razão M/A nas células incubadas com DHA 7 mM, indicativo de diminuição do potencial de membrana mitocondrial.

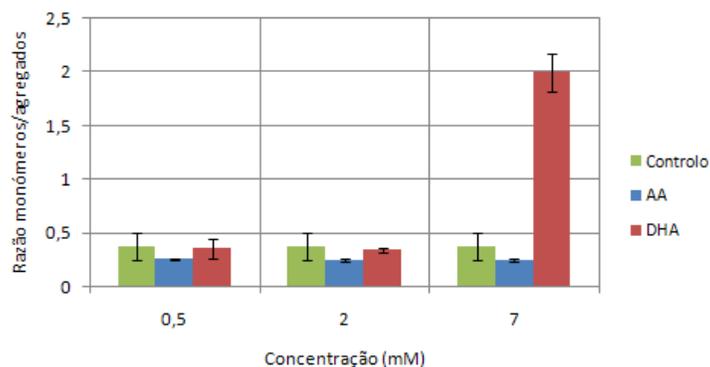


Gráfico 26 – Avaliação do potencial de membrana por citometria de fluxo. As células WiDr foram tratadas com diferentes concentrações de AA e DHA, referenciadas no gráfico, durante 48 h. Posteriormente, foram marcadas com a sonda fluorescente JC-1 e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média de duas experiências independentes.

3.3. Estudos *in vivo*

Com o objectivo de estudar o composto marcado e esclarecer os resultados obtidos no controlo de qualidade, foram realizados estudos *in vivo* que incluíram estudos de biodistribuição e imagiologia com $^{99m}\text{Tc-AA}$, em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais.

A análise do Gráfico 27, obtido após os estudos de biodistribuição com $^{99m}\text{Tc-AA}$ e respectiva quantificação de dose injectada por grama de órgão, mostra, essencialmente, excreção por via urinária (rim, urina e bexiga) e, também, via ciclo entero-hepático (fígado, vesícula biliar e bÍlis). De facto, não se verifica captação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ por nenhum órgão preferencial. Com a progressão no tempo, ou seja, dos 30 para os 60 minutos, existe uma diminuição da percentagem de captação por grama de sangue, o que se observa também com o fígado e com a vesícula biliar. O contrário se

verifica em órgãos como o intestino delgado, a bexiga e os genitais, em que a percentagem de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ aumenta.

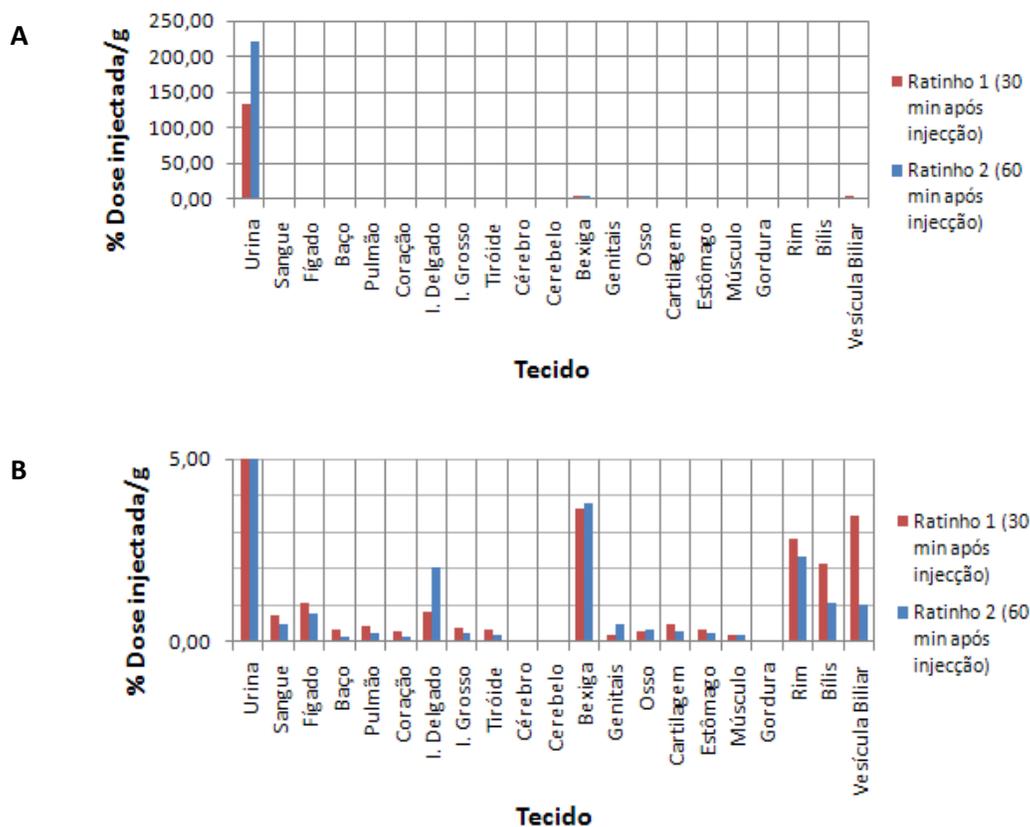


Gráfico 27 – (A) Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-AA}$. Depois de passados 30 e 60 minutos da administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados, os órgãos colhidos e a percentagem de dose injectada por grama de tecido quantificada. **(B) Fração percentual do gráfico A.**

As imagens adquiridas nos estudos imagiológicos foram processadas e normalizadas a uma escala de cores linear, onde o preto corresponde ao mínimo de actividade e o branco ao máximo. Foram, então, desenhadas regiões de interesse (ROIs) nos seguintes órgãos: tiróide, estômago, fígado, rim e bexiga, como exemplificado na Figura 11. Desta forma, avaliámos não só a existência de impurezas radioquímicas, na medida em que a acumulação de $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ se dá ao nível da tiróide e do estômago e, por sua vez, a acumulação de $^{99m}\text{Tc-RH}$ se verifica ao nível do fígado e do baço, mas também as vias de excreção (urinária e hepato-biliar).

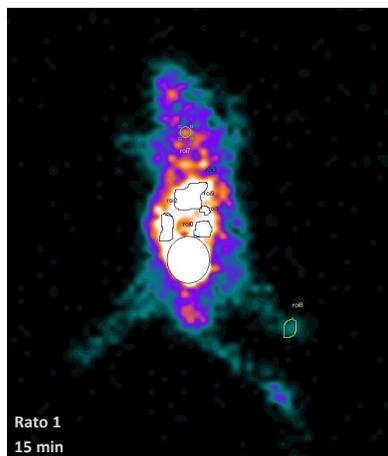


Figura 11- Imagem representativa das ROIs desenhadas. Após a aquisição das imagens estáticas em câmara-gama, estas foram processadas, desenhando ROIs e, posteriormente, quantificada a actividade.

A partir da quantificação das ROIs foi também determinada a razão órgão alvo/fundo. Considerando que, quanto mais a razão órgão alvo/fundo se aproxima de 1, mais semelhante é a acumulação de $^{99m}\text{Tc-AA}$ no respectivo órgão com a do fundo, verifica-se que a acumulação ao nível da tiróide e estômago é reduzida e ao nível do rim e fígado é ligeiramente superior (Gráfico 28). Estes dados são concordantes com os da biodistribuição revelando excreção renal e hepato-biliar, assim como, a reduzida presença de impurezas radioquímicas.

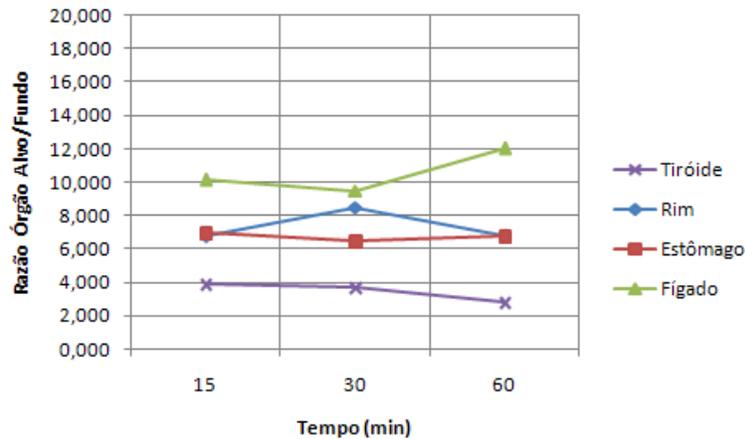


Gráfico 28 - Razão órgão alvo/fundo. Após a obtenção das imagens estáticas por câmara-gama, estas foram processadas e ROIs em determinados órgãos de interesse foram desenhadas. Posteriormente, foi determinada a razão órgão alvo/fundo, evidenciada no gráfico.

A Figura 12 apresenta imagens estáticas adquiridas 15, 30 e 60 minutos após a injeção do radiofármaco, a partir das quais é possível observar uma diminuição da actividade de fundo ao longo do tempo. Por outro lado, é também visível a elevada acumulação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ ao nível da bexiga e rins.

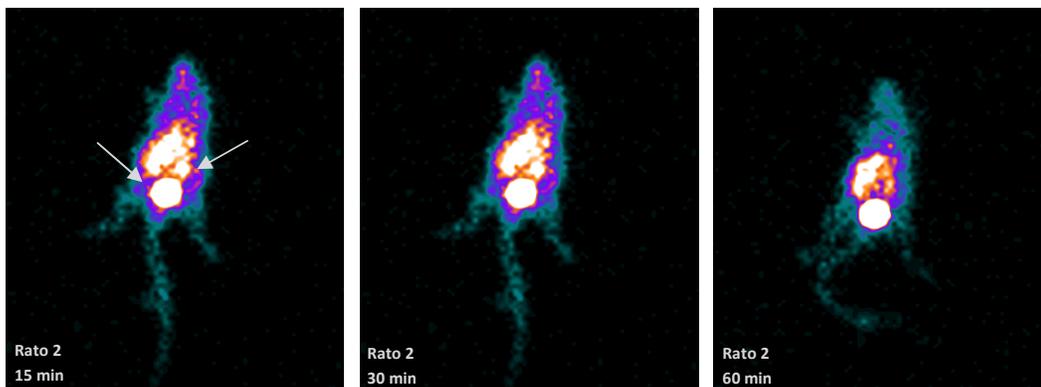


Figura 12 - Imagens estáticas adquiridas em câmara-gama. O complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ foi administrado ao ratinho 2 e, 15, 30 e 60 minutos depois, foram adquiridas imagens estáticas e processadas a uma escala de cores linear.

Capítulo IV

Discussão

O presente trabalho permitiu alcançar alguns avanços, tanto ao nível da medicina nuclear como da biologia molecular. Os resultados por nós obtidos poderão ter grande utilidade na tão antiga e controversa história da vitamina C no tratamento do cancro.

A primeira fase deste trabalho incidiu na marcação radioactiva da vitamina C. Inicialmente, e baseados numa formulação publicada (Yigit, et al., 2006), utilizámos como agente redutor o cloreto de estanho dihidratado. Contudo, para além desta formulação se ter mostrado ineficaz, o controlo de qualidade não permitia a determinação da pureza radioquímica. Devido a estas razões, esta formulação foi abandonada. Posteriormente, e após consulta de algumas publicações dos anos 70 (Hauser, et al., 1971; Stapleton, et al., 1967; Persson, et al., 1975), experimentou-se usar como agente de redutor o cloreto de ferro (III) (FeCl_3).

Para a marcação radioactiva da forma reduzida da vitamina C (AA), foi necessário ter em conta alguns aspectos químicos dos diferentes compostos em questão. O pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), eluído a partir de um gerador $^{99\text{m}}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, é o composto a partir do qual se obtém tecnécio no estado de oxidação +7 e, por isso, fortemente deficiente em electrões. Contudo, para marcar o ligando (neste caso, o AA) o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tem que ser reduzido a estados de oxidação inferiores (III ou IV), daí a necessidade de um agente redutor. Por outro lado, para ceder electrões ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$, e assim diminuir o seu estado de oxidação, o cloreto de ferro (III) necessita de passar a cloreto de ferro (II). Supomos que o AA tenha um papel de extrema importância neste processo.

Assim, aliando os aspectos químicos mencionados e os procedimentos de marcação efectuados, o processo a partir do qual sugerimos que ocorra a formação do

complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ é descrito seguidamente. Ao se adicionar o FeCl_3 ao ^{99m}Tc , como primeiro passo do procedimento de marcação, estes não reagem entre si, visto que o agente redutor não possui electrões para ceder. Só posteriormente, quando é adicionado o AA, é que irá ocorrer a oxidação do cloreto de ferro (III) com a formação de cloreto de ferro (II). Por sua vez, o cloreto de ferro (II) cede electrões ao $^{99m}\text{Tc(VII)}$ reduzindo-o a $^{99m}\text{Tc(III)}$ ou $^{99m}\text{Tc(IV)}$. Nestes estados de oxidação torna-se então possível a formação do complexo de $^{99m}\text{Tc-AA}$, que poderá, ou não, incluir o cloreto de ferro na sua constituição. A relativa complexidade da reacção de formação do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ pode ser a razão pela qual esta se processa tão lentamente, de tal modo que, em determinados casos, as eficiências de marcação elevadas só foram atingidas 24 horas após a adição do ligando.

A pureza radioquímica do complexo foi controlada por HPLC, permitindo assim averiguar as condições óptimas para a obtenção de elevado grau de pureza. Foram testados diversos volumes de cloreto de ferro (0,1 N) e diferentes concentrações de AA, até se terem atingido as condições óptimas de agente redutor e ligando, que foram de 0,2 mL de FeCl_3 e 200 mg de AA. Para além disso, verificámos que quando o processo de marcação era realizado em locais em que a temperatura ambiente era mais elevada, a eficiência de marcação era consideravelmente mais baixa. Por esta razão, minimizámos o efeito da temperatura, procedendo à marcação em gelo (0-4°C), tendo-se obtido um aumento considerável na pureza radioquímica. Por outro lado, após várias tentativas, verificámos também que o pH era outro factor que influenciava a eficiência de marcação. Assim, verificou-se que, quando o pH era de 6,5 e, quando os componentes se encontravam em atmosfera argonada a eficiência de marcação era maior. É de referir também, que a microcromatografia ascendente deverá ser

otimizada com o intuito de se obter resultados de forma eficiente e de maneira mais simples.

Para analisarmos os efeitos biológicos da vitamina C no cancro do cólon, a par do processo de marcação do AA foram também realizados estudos *in vitro* com uma linha celular de adenocarcinoma do cólon, as células WiDr. Começámos por analisar o influxo das duas formas da vitamina C, oxidada (AA) e reduzida (DHA) recorrendo a estudos de captação e de estabilidade por HPLC.

A partir dos estudos de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ podemos concluir que não há captação significativa do complexo pelas células de adenocarcinoma do cólon. De facto, e apesar das variações na percentagem de captação em ambas as concentrações analisadas, verifica-se que estas não excedem os 2,5 % (Gráfico 8). Por outro lado, quando comparámos as percentagens de captação do $^{99m}\text{Tc-AA}$ e do $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$, verificamos que são semelhantes e, quando não são, a do $^{99m}\text{Tc-O}_4^-$ é maioritariamente superior (Gráfico 9). Assim, podemos concluir que a captação verificada pode ser devida à existência desta impureza radioquímica ($^{99m}\text{Tc-O}_4^-$) na solução de $^{99m}\text{Tc-AA}$. Estes resultados estão de acordo com estudos efectuados por outros autores que mostram que as células tumorais não são capazes de transportar directamente o AA (Agus, et al., 1999), o que justifica os valores reduzidos de captação da forma reduzida da vitamina C marcada nas nossas células.

Uma vez que o pH pode influenciar as reacções de oxidação-redução e como o tratamento das células WiDR com vitamina C diminui o pH extracelular, fomos analisar, por HPLC, o efeito do pH na oxidação do AA em DHA e/ou na redução do DHA a AA. Assim, quando ao meio DMEM acidificado se adicionou AA, na ausência de células, não

observámos a presença de nenhum pico correspondente ao DHA, o que sugere que não ocorreu oxidação do AA em DHA (Gráfico 11). Da mesma forma, quando ao meio DMEM adicionámos DHA, os cromatogramas obtidos não revelaram a existência de AA, o que nos permite concluir que não ocorre redução do DHA a AA. Consequentemente, é lícito afirmar que o pH não é suficiente para que ocorram reacções que permitam a interconversão das duas formas da vitamina C, o que sugere que a alteração do pH não influencia os efeitos biológicos da vitamina C observados nas nossas células. No entanto, estas observações não excluem a possibilidade da acidificação inibir o transporte de AA, interferindo com a sua eficácia biológica, como descrito por alguns autores (Wilson, 2005).

Para verificarmos qual ou quais da(s) forma(s) de vitamina C atravessam a membrana celular para o interior das células WiDR, fomos avaliar a presença de AA e de DHA no meio extracelular. Assim, nas células tratadas com AA, detectámos a existência de um pico referente ao AA, e nenhum relativo ao DHA (Gráfico 13). Estes resultados estão de acordo com os estudos de captação e com o descrito por outros autores (Agus, et al., 1999) e sugerem que o AA não é capaz de atravessar a membrana das células, o que justifica a sua permanência no meio extracelular. No entanto, a quantidade de AA detectada por HPLC no meio extracelular é inferior à quantidade com que as células foram incubadas, o que indica que poderá ter ocorrido oxidação do AA com formação de DHA. Ora, o DHA é capaz de atravessar as membranas celulares através do sistema de transporte GLUT1 e, uma vez no interior das células, é convertido em AA por uma reductase. Este AA permanece no interior das células que não possuem sistemas de transporte para este composto (Agus, et al., 1999). Estas

observações podem explicar a diminuição de AA e a ausência de DHA no meio extracelular. Por outro lado, nas células tratadas com DHA não detectámos a presença de AA (Gráfico 15), o que nos leva a concluir, como seria de esperar, que não ocorre formação de AA por redução do DHA no meio extracelular. No entanto, nos cromatogramas obtidos verifica-se a presença de DHA que, apesar de reduzida, pode ser significativa, quando as células foram tratadas com concentrações elevadas de DHA. Este facto poderá ser hipoteticamente explicado por uma saturação ao nível dos transportadores de membrana que, na presença de elevadas concentrações do composto, deixam de o poder transportar (Agus, et al., 1999; Rumsey, et al., 1997).

Após confirmarmos qual a forma de vitamina C predominante no meio extracelular das nossas células, fomos avaliar a sua potencial utilização terapêutica no cancro do cólon. Para o efeito, tratámos células obtidas de um doente com adenocarcinoma do cólon, as células WiDR, com as duas formas de vitamina C e avaliámos os seus efeitos na proliferação e na viabilidade celular, por colorimetria e por citometria de fluxo.

Os nossos resultados mostram que o AA e o DHA em baixas doses (até 0,5 mM) induzem proliferação celular, enquanto que em doses elevadas possuem um efeito anti-proliferativo nas células de adenocarcinoma do cólon, sobretudo quando as células são tratadas com DHA (Gráfico 17 e Gráfico 18). De facto, quando as células foram tratadas com DHA observámos inibição de 50% na proliferação celular (IC50), mais precocemente e para concentrações inferiores às utilizadas para o AA (Gráfico 17 e Gráfico 18). Os efeitos antiproliferativos observados podem estar relacionados com a capacidade do DHA impedir a activação do IKK β , uma enzima essencial à fosforilação

do inibidor do NF- κ B, o I κ B. Se o I κ B não estiver fosforilado, não é degradado, permanecendo ligado ao NF- κ B, impedindo a sua acção. Ora, o NF- κ B é um factor de transcrição que está envolvido na transcrição de múltiplos genes que codificam proteínas com várias funções na célula, nomeadamente na progressão do ciclo celular (Cárcamo, et al., 2004).

Este efeito anti-proliferativo, predominantemente, do DHA é acompanhado de um efeito citotóxico, como demonstram os estudos efectuados por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo (IP). De facto, nas células tratadas com DHA, na concentração de 7 mM, observámos diminuição da percentagem de células viáveis e aumento do número de células em apoptose tardia e/ou necrose (Gráfico 20). Esta técnica, como já referimos, baseia-se no facto de que, quando as células entram em apoptose, a fosfatidilserina, um fosfolípido habitualmente do folheto interno da membrana celular, exterioriza-se e liga-se à anexina. Desta forma as células que entram em apoptose marcam positivamente para este fluorocromo. Por outro lado, numa fase mais avançada de apoptose, e/ou quando as células entram em necrose, a membrana celular torna-se permeável, permitindo a entrada do iodeto de propídeo na célula, o qual ao intercalar-se no ADN emite fluorescência. Pelo contrário, as células viáveis não apresentam positividade para nenhum dos fluorocromos (Gráfico 19) (Chen, et al., 2008).

Um dos mecanismos que tem sido sugerido para o efeito citotóxico selectivo da vitamina C nas células tumorais envolve o stresse oxidativo (Chen, et al., 2005). De facto, nos processos de interconversão da vitamina C ocorre formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Por outro lado, há evidências de que as células tumorais

possuem uma diminuição da concentração de catalase num factor de 10 a 100. De salientar que a catalase é responsável pela destoxificação do H_2O_2 . Desta forma, a diminuição da catalase nas células tumorais promove a acumulação de H_2O_2 formado a partir da oxidação da vitamina C. Este facto pode assim estar na origem do efeito pró-oxidante da vitamina C e, conseqüentemente, explicar os efeitos citotóxicos evidenciados (Drisko, et al., 2003; Li, et al., 2007).

Tendo em conta a argumentação anterior, fomos avaliar a presença de ROS, nomeadamente de peróxidos intracelulares e de anião superóxido. Para o efeito recorreremos à marcação das células com DCFH₂-DA e com DHE, respectivamente, e posterior análise por citometria de fluxo. O DCFH₂-DA, uma molécula lipossolúvel não fluorescente, entra dentro das células, é hidrolisada por esterases, libertando o DCFH. Este liga-se aos peróxidos intracelulares, com formação de DCF, que emite fluorescência (Tarpey, et al., 2003). Por sua vez, o DHE atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídeo, composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no ADN, permanecendo no interior da célula (Zhao, et al., 2005).

Como já referimos, os nossos resultados mostram nas células tratadas com DHA, em baixa concentração, um aumento dos peróxidos, enquanto que, em concentrações elevadas, observámos o efeito contrário (Gráfico 22). Em nenhuma das condições observámos variações significativas de anião superóxido (Gráfico 24).

Apesar de termos observado citotoxicidade para níveis elevados de vitamina C, sobretudo de DHA, e de nestas condições verificarmos diminuição acentuada dos níveis de peróxidos, sugerimos que estas espécies poderão ter sido convertidas em espécies mais lesivas para a célula como o radical hidroxilo (OH^*) e/ou peróxido nítrico

(ONOO⁻). Estas espécies reactivas não foram medidas, no entanto, esta justificação é extremamente plausível, na medida em que, na presença de ferro livre, o peróxido de hidrogénio é transformado pela reacção de Fenton/Haber Weiss em radical OH[•], e o anião superóxido, na presença de óxido nítrico NO[•], pode ser convertido em ONOO⁻. Estes radicais livres são bastante reactivos e tóxicos para a célula podendo induzir morte celular (Li, et al., 2007; Valko, et al., 2007).

Sabe-se que, consoante as concentrações em que estiverem presentes, as ROS podem, tanto ter efeitos proliferativos, como efeitos citotóxicos nas células. Normalmente, os efeitos proliferativos verificam-se quando as ROS se encontram em baixas concentrações, e podem ser traduzidos pela activação de genes e, conseqüente, indução e manutenção das vias de transdução de sinal, assim como, pela promoção da função imunitária. Por outro lado, quando presentes em altas concentrações, as ROS podem provocar a morte celular pela lesão oxidativa de biomoléculas (DNA, lípidos, proteínas e açúcares), assim como, pela promoção da disfunção mitocondrial (Valko, et al., 2007). Estas evidências explicam os efeitos antagónicos provocados pela vitamina C na proliferação e viabilidade celulares.

Para confirmarmos a participação da mitocôndria nos efeitos biológicos da vitamina C fomos avaliar o potencial de membrana mitocondrial pela marcação com JC-1. Como já referimos, esta molécula existe sob duas formas, monómeros (M) e agregados (A), dependendo do potencial de membrana mitocondrial. Desta forma, quanto maior a razão M/A, menor o potencial de membrana (ψ), o que implica alterações na função mitocondrial e, conseqüentemente, morte celular por apoptose e/ou necrose. Por outro lado, a diminuição da razão M/A, traduz o aumento do

potencial de membrana (ψ), o que pode estar relacionado com a proliferação celular (Yao, et al., 2008).

Os nossos estudos estão de acordo com o referido anteriormente e confirmam os resultados obtidos nos estudos de proliferação. De facto, observámos diminuição da razão M/A, nas condições em que a vitamina C induziu proliferação celular, e um aumento muito acentuado desta razão nas concentrações em que observámos morte celular, ou seja, com concentrações elevadas de DHA (Gráfico 26). Tais resultados sugerem que a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, poderá estar relacionado com o efeito citotóxico da vitamina C nas células de adenocarcinoma do cólon.

Como verificámos, os efeitos citotóxicos e anti-proliferativos da vitamina C são mais precoces e para concentrações mais baixas de DHA do que de AA. Este facto pode ser explicado pela análise do metabolismo das duas formas da vitamina C, a forma reduzida, AA, e a forma oxidada, DHA, que efectuámos por HPLC. A forma reduzida, não entra directamente nas células tumorais, entrando de forma indirecta, por oxidação em DHA o qual atravessa as membranas celulares utilizando o transportador GLUT-1 (Agus, et al., 1999). Existem evidências de que as células tumorais não possuem transportadores dependentes de sódio (SVCTs), logo não transportam AA, mas apresentam sobreexpressão do transportador GLUT (Li, et al., 2007), um sistema de transporte utilizado pelo DHA. Assim, podemos concluir que, tanto a sobreexpressão dos transportadores (GLUT) como o transporte directo do DHA pelos mesmos, sejam factores que promovam a acumulação do DHA intracelular, a sua conseqüente redução a AA, e posteriormente, a indução da formação das ROS responsáveis pelo efeito

Citotoxicidade Selectiva da Vitamina C

citotóxico. Este processo será hipoteticamente mais rentável com o transporte directo do DHA para o interior da célula do que com o transporte indirecto de AA. Estes factos podem justificar os efeitos anti-proliferativo e citotóxicos tardios da forma reduzida da vitamina C, o AA.

A partir dos estudos *in vivo* foi possível averiguar as vias de excreção e metabolização do composto marcado e o controlo de qualidade do mesmo recorrendo à técnica de HPLC. A partir dos estudos de biodistribuição, assim como, dos estudos imagiológicos com $^{99m}\text{Tc-AA}$, pudemos verificar que a excreção do complexo se efectua via renal e hepato-biliar (Gráfico 27 e Figura 12). Para além disso, a partir destes estudos verificámos uma reduzida acumulação do radiofármaco em órgãos onde preferencialmente se acumulam impurezas radioquímicas, tais como, tiróide, estômago, fígado e baço. Estes dados levam-nos a concluir que a formulação farmacêutica desenvolvida e analisada possuía um elevado grau de pureza radioquímica, e que poderia ser usada para o objectivo proposto.

Conclusão

Seguidamente, apresentam-se as principais conclusões que foram obtidas a partir da análise dos resultados do nosso trabalho, envolvendo a marcação radioactiva da vitamina C e os estudos biológicos efectuados *in vitro* e *in vivo*.

De todo o trabalho realizado, desde a preparação da formulação farmacêutica, até à obtenção de imagem, passando pelo desenvolvimento de todo um conjunto de procedimentos para controlo de qualidade da pureza radioquímica, em relação à marcação radioactiva do ácido ascórbico (AA), a forma reduzida da vitamina C, concluímos que:

- ❖ Foi desenvolvida e optimizada uma formulação farmacêutica, para obtenção do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$, com elevado grau de pureza radioquímica, como mostram os estudos de HPLC.

- ❖ Foi igualmente desenvolvido por HPLC, um método de controlo de qualidade, que tornou possível a separação dos diferentes compostos radioactivos presentes na formulação farmacêutica.

- ❖ A reacção de formação do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ é lenta, na medida em que se obtiveram elevadas eficiências de marcação, 24 horas após a adição de ligando.

- ❖ A microcromatografia ascendente em camada fina deverá ser ainda optimizada, com o intuito de se obterem resultados de forma mais eficiente e simples.

Relativamente aos estudos *in vitro*, realizados em células de adenocarcinoma do cólon, WiDr, pudemos retirar as seguintes conclusões:

❖ As células de adenocarcinoma do cólon não são capazes de transportar directamente o AA, visto que a captação do complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ por estas é muito reduzida.

❖ O pH não influencia os efeitos biológicos da vitamina C observados nas células de adenocarcinoma do cólon, dado que a acidificação do meio, na ausência de células, não se mostrou ser suficiente para permitir a interconversão das duas formas da vitamina C. Pode, contudo, interferir no transporte desta vitamina através das membranas celulares.

❖ Os nossos estudos sugerem que o AA não atravessa a membrana celular das nossas células, contudo, no meio extracelular, este composto poderá ser oxidado, formando DHA.

❖ A diminuição de DHA no meio extracelular das células tratadas com este composto, sugere que o DHA atravessa a membrana das células de adenocarcinoma do cólon e, no citoplasma, é rapidamente convertido em AA, o qual fica retido no interior das células. De facto, no meio extracelular, não observámos aumento da concentração de AA nas células tratadas com DHA.

❖ As duas formas da vitamina C induzem um efeito na proliferação das células de adenocarcinoma do cólon, de forma dependente da dose. Baixas concentrações de AA e DHA (até 0,5 mM) induzem a proliferação celular, enquanto que concentrações mais elevadas têm um efeito anti-proliferativo.

❖ No entanto, o efeito anti-proliferativo do DHA é mais acentuado que o do AA. De facto, o IC50 é atingido mais precocemente e para concentrações inferiores de DHA relativamente às de AA.

❖ O efeito anti-proliferativo é acompanhado de um efeito citotóxico, dada a diminuição da viabilidade celular e, conseqüente, aumento de morte celular por apoptose tardia e necrose que verificámos.

❖ O efeito citotóxico do DHA poderá estar relacionado com a produção de ROS, nomeadamente, pela conversão de peróxidos em espécies bastante reactivas e tóxicas, tais como, o radical hidroxilo e o peróxido nítrico, o que está de acordo com a morte celular por apoptose tardia/necrose que observámos.

❖ A disfunção mitocondrial, avaliada pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial, é outro dos mecanismos que está relacionado com o stress oxidativo e que pode contribuir para o efeito citotóxico de elevadas doses de vitamina C nas células de adenocarcinoma do cólon.

❖ Os nossos resultados sugerem que, nas células WiDR, o transporte directo do DHA para o interior das células deverá estar relacionado com a sobreexpressão dos GLUT. Por outro lado, o DHA, directamente ou por posterior redução a AA, pode induzir a morte das células de adenocarcinoma do cólon podendo constituir uma abordagem terapêutica neste tipo de neoplasias.

Por último, podemos retirar algumas conclusões dos estudos *in vivo* realizados:

❖ O complexo $^{99m}\text{Tc-AA}$ é excretado por via renal e hepato-biliar.

❖ A formulação farmacêutica de $^{99m}\text{Tc-AA}$ possui uma elevada eficiência de marcação, sustentada por estudos de biodistribuição e imagiológicos, a qual permitiu a utilização do composto para o objectivo proposto.

Trabalho Futuro

Com o intuito de melhorar os resultados por nós obtidos, sugere-se a marcação da forma oxidada da vitamina C, recorrendo à adição de ascorbato oxidase à formulação farmacêutica por nós desenvolvida para marcação da forma reduzida. Este protocolo tem sido seguido, por muitos autores, em processos de marcação do DHA com ^{14}C (Maulén, et al., 2002; Cárcamo, et al., 2004; Agus, et al., 1997; Savini, et al., 2000; Holmes, et al., 2002).

Dadas as dificuldades que surgiram na análise da presença de DHA por HPLC, sugere-se que, futuramente, seja desenvolvido um método de HPLC que permita separar claramente este composto. Um possível protocolo é apresentado por Savini, et al., 2000.

Considerando que a citotoxicidade da vitamina C só foi avaliada por citometria de fluxo, após tratamento das células de adenocarcinoma do cólon durante 48 horas, sugere-se que seja determinada para outros tempos de exposição de AA e DHA, permitindo assim fazer uma avaliação ao longo do tempo. Para confirmarmos os mecanismos envolvidos na citotoxicidade da vitamina C, sugere-se a medição do radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) e das espécies reactivas de nitrogénio, nomeadamente, do peróxido nitrito (ONOO^-).

Bibliografía

- Agus David B. [et al.]** Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters [Jornal]. - [s.l.] : J. Clin. Invest, 1997. - Vol. 100(11).
- Agus David B., Vera Juan C. e Golde David W.** Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C [Jornal]. - [s.l.] : Cancer Research, 1999. - Vol. 59.
- Budd Samantha L., Castillo Roger F. e Nicholls David G.** Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells [Jornal]. - [s.l.] : FEBR, 1997. - Vol. 415.
- Cameron Ewan e Campbell Allan** The orthomolecular treatment of cancer - II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer [Jornal]. - [s.l.] : Chem.-Biol. Interactions, 1974. - Vol. 9.
- Cárcamo Juan M. [et al.]** Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I κ B α Kinase B [Jornal]. - [s.l.] : Molecular and cellular biology, 2004. - Vol. 24(5).
- Chen Qi [et al.]** Pharmacological ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues [Jornal] // PNAS. - 2005.
- Chen Shun [et al.]** Detection of apoptosis induced by a new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling [Jornal]. - [s.l.] : World J. Gastroenterol., 2008. - Vol. 14(14).
- Clark Jim** High Performance Liquid Chromatography - HPLC [Online]. - 2007. - 16 de Abril de 2008. - <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>.
- Corpe Christopher P. [et al.]** 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid [Jornal]. - [s.l.] : The Journal of Biological Chemistry, 2004. - Vol. 280(7).
- Darzynkiewicz Zbigniew [et al.]** Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis) [Jornal]. - [s.l.] : Cytometry, 1997. - Vol. 27.
- Deuter Dayna** [Online]. - 2008 de Junho de 30. - www.drdarvish.com/articles/14-Women-Cancer-Antioxidants-Cancer-Therapy.pdf.
- Dikalov Sergey, Griendling Kathy K. e Harrison David G.** Measurement of reactive species in cardiovascular studies [Jornal]. - [s.l.] : Hypertension, 2007. - Vol. 49.
- Drisko Jeanne A., Chapman Julia e Hunter Verda J.** The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer [Jornal]. - [s.l.] : Journal of the American College of Nutrition, 2003. - Vol. 22 (2).
- González Michael J. [et al.]** Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and 25 years later [Jornal]. - [s.l.] : Integrative Cancer Therapies, 2005. - Vol. 4 (1).
- Hauser W., Atkins H. L. e Richards P.** Renal uptake of ^{99m}Tc-iron-ascorbic acid complex in man [Jornal]. - [s.l.] : Radiology, 1971. - Vol. 101.

Citotoxicidade Selectiva da Vitamina C

Helwig Bryan Vitamin C [Online] // Diet & Nutrition. - 2008 de Abril de 28. - <http://www.exrx.net/Nutrition/Antioxidants/VitaminC.html>.

Holmes Melanie E. [et al.] Dehydroascorbic acid uptake by coronary artery smooth muscle: effect of intracellular acidification [Jornal]. - [s.l.] : Biochem. J., 2002. - Vol. 362.

Iqbal Khalib, Khan Alam e Khattak M. Muzaffar Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health - a review [Jornal]. - [s.l.] : Pakistan Journal of Nutrition, 2004. - Vol. 3 (1).

Lee Ki Won [et al.] Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal [Jornal]. - [s.l.] : Am. J. Clin. Nutr. , 2003. - Vol. 78.

LGC/ATCC LGC Promochem [Online] // Product Description. - 2006. - 3 de Julho de 2008. - <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-218>.

Li Yi e Schellhorn Herb B. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C [Jornal]. - [s.l.] : Journal of Nutrition, 2007.

Lutsenko Eugene A., Cárcamo Juan M. e Golde David W. Vitamin C prevents DNA mutation by oxidative stress [Jornal] // The Journal of Biological Chemistry. - 2002.

Mariotto Juliana Ribeiro Cinética enzimática [Relatório]. - 2006.

Maulén Nancy P. [et al.] Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic transporter SVCT1 in post-confluent differentiated CaCo-2 cells [Jornal]. - [s.l.] : The Journal of Biological Chemistry, 2002. - Vol. 278 (11).

McEligot Archana Jaiswal, Yang Sun e Meyskens Frank L. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells [Jornal]. - [s.l.] : Annu. Rev. Nutr., 2005. - Vol. 25.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [Jornal]. - [s.l.] : J. Immunol. Methods, 1983. - Vols. 65(1-2).

Moss Ralph W. Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? [Jornal]. - [s.l.] : Integrative Cancer Therapies, 2006. - Vol. 5 (1).

Padayatty Sebastian J. [et al.] Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases [Jornal]. - [s.l.] : CMAJ, 2006. - Vol. 174 (7).

Padayatty Sebastian J. [et al.] Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous administration use [Jornal]. - [s.l.] : Ann Intern Med, 2004. - Vol. 140 (7).

Padayatty Sebastian J. and Levine Mark New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C [Jornal]. - [s.l.] : CMAJ, 2001. - Vol. 164 (3).

- Padayatty Sebastian J. e Levine Mark** Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity [Jornal]. - [s.l.] : Journal of the American College of Nutrition, 2005. - Vol. 19 (4).
- Peres Terezinha Bonanho** Noções básicas de cromatografia [Jornal]. - [s.l.] : Biológico, 2002. - Vol. 64(2).
- Persson R. B., Strand S. E. e White T.** 99mTc-ascorbate; preparation, quality-control and quantitative renal uptake in man [Jornal]. - [s.l.] : International Journal of Nuclear Medicine and Biology, 1975. - Vol. 2.
- Prasad Kedar N. [et al.]** High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy [Jornal]. - [s.l.] : Journal of the American College of Nutrition, 1999. - Vol. 18 (1).
- Ribeiro Ana Bela Sarmento** Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia [Livro]. - Universidade de Coimbra : [s.n.], 2000.
- Riordan H. N. [et al.]** Intravenous ascorbate as a tumor cytotoxic chemotherapeutic agent [Jornal]. - [s.l.] : Medical Hypotheses, 1994. - Vol. 44.
- Riordan Neil H., Riordan Hugh D. e Hunninghake Ronald E.** Intravenous ascorbate as a chemotherapeutic and biologic response modifying agent [Relatório]. - 1997.
- Robbins Philip J.** Chromatography of technetium-99m radiopharmaceuticals - a practical guide [Jornal]. - [s.l.] : The Society of Nuclear Medicine, 1984.
- Rumsey Steven C. [et al.]** Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid [Jornal]. - [s.l.] : The Journal of Biological Chemistry, 1997. - Vol. 272(30).
- Saha Gopal B.** Fundamentals of Nuclear Pharmacy [Livro]. - USA : Springer, 2003.
- Sarkar Mita [et al.]** Flow-cytometry analysis of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells of patients with thyroid dysfunction [Jornal]. - [s.l.] : Cytometry (Clinical Cytometry), 2005. - Vol. 70B.
- Savini Isabella, Dufлот Sylvie e Avigliano Luciana** Dehydroascorbic acid uptake in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is glutathione-independent [Jornal]. - [s.l.] : Biochem. J., 2000. - Vol. 345.
- Silva Teresa Lopes [et al.]** Citometria de fluxo - funcionalidade on-line em bioprocessos [Jornal]. - [s.l.] : Boletim de Biotecnologia.
- Stapleton Joseph E., Odell R. W. e McKamey Michael R.** Technetium/iron/ascorbic acid complex: a good brain agent [Jornal]. - [s.l.] : Am. J. Roentg. Rad. Ther. and Nucl. Med., 1967. - Vol. 101.
- Suzuki Y. J., Forman H. J. e Sevanian A.** Oxidants as stimulators of signal transduction [Jornal]. - [s.l.] : Free Radical Biology & Medicine, 1997. - Vol. 22 (1 e 2).

Tarpey Margaret M., Wink David A. e Grisham Matthew B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations [Jornal]. - [s.l.] : Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol, 2003. - Vol. 286(43).

Valko Marian [et al.] Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [Jornal]. - [s.l.] : The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. - Vol. 39.

Walingo Mary Role of vitamin C (ascorbic acid) on human health - a review [Jornal]. - [s.l.] : African Journal of Food Agriculture, Nutrition and Development, 2005. - Vol. 5 (1).

Wilson John X. Regulation of vitamin C transport [Jornal]. - [s.l.] : Annu. Rev. Nutr., 2005. - Vol. 25.

Yao Jincheng [et al.] Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells [Jornal]. - [s.l.] : Biol. Pharma. Bull., 2008. - Vol. 31(4).

Yigit Ugur Sezai [et al.] Preparation of ^{99m}Tc lebeled vitamin C (ascorbic acid) and biodistribution in rats [Jornal]. - [s.l.] : Chem. Pharm. Bull., 2006. - Vol. 54 (1).

Zhao Hongtao [et al.] Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracelular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence [Jornal]. - [s.l.] : PNAS, 2005. - Vol. 102(16).