



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

NOVA ABORDAGEM NO TRATAMENTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DO FÍGADO: O PAPEL DA QUERCETINA

Marina Raquel Duarte Ribeiro

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

NOVA ABORDAGEM NO TRATAMENTO DE TUMORES PRIMÁRIOS DO FÍGADO: O PAPEL DA QUERCETINA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra)

Marina Raquel Duarte Ribeiro

2013

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

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

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para o culminar desta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora desta dissertação, por me ter acolhido na sua equipa, pelo apoio, disponibilidade e dedicação incondicionais e, sobretudo, pela partilha de conhecimento e experiência científica, como também a confiança depositada no meu trabalho.

À Professora Doutora Rosa Maria dos Santos, orientadora interna desta dissertação, pela disponibilidade, colaboração e simpatia sempre demonstradas.

Gostaria também de agradecer ao Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO) pela disponibilização da verba essencial para a realização de parte deste trabalho. Uma palavra de agradecimento também à Bayer Healthcare pelo fornecimento do sorafenib.

À Mestre Margarida Abrantes agradeço pela coorientação, apoio e disponibilidade incontestáveis e, em especial, pelo constante interesse e preocupação com o meu trabalho.

À Mestre Ana Filipa Brito preciso, especialmente, de agradecer pelo tempo cedido em acompanhar-me de forma tão próxima e generosa ao longo destes meses de trabalho. Pelo apoio incondicional, dedicação, disponibilidade e incentivo permanentes. Muito obrigado Ana, do fundo do coração, por todos os ensinamentos partilhados e que enriqueceram bastante a minha experiência científica.

À Mestre Mafalda Laranjo, pela sua colaboração, disponibilidade e sugestões sempre preciosas e pertinentes. Ao Mestre João Casalta pelo contributo imprescindível e horas de trabalho despendidas na análise estatística dos resultados, pela paciência, empenho e simpatia demonstrados. À Cláudia Caridade pelo apoio, disponibilidade e simpatia diária. À Mestre Cristina Gonçalves pelo auxílio prestado na realização dos estudos de citometria de fluxo. Às Mestres Salomé Pires e Catarina Mamede pelo exemplo de trabalho em equipa, apoio e disponibilidade constantes mas, especialmente, pela amizade e momentos de boa disposição. Também aos Mestres Sara Ferreira e Fernando Mendes pela cooperação, simpatia e alegria contagiante.

A todos os meus colegas de laboratório no IBILI, agradeço por me acompanharem diariamente e tornarem os dias cheios de boa-disposição e por todos os momentos de companheirismo, Ricardo Teixeira, Kathleen Santos, Telmo Gonçalves, João Encarnação e Vera Silva, e a todos os outros que passaram por este laboratório, demonstrando um grande espírito de camaradagem.

À minha querida e linda amiga, Raquel Marques, pelo apoio incondicional, por todo o companheirismo e amizade genuína em cada dia, por todos os nossos momentos de devaneio e tremenda diversão. A ti, minha confidente, agradeço especialmente por ao longo destes meses de trabalho teres estado comigo de forma tão verdadeira, sem dúvida, que sem ti estes meses não teriam sido os mesmos.

Às minhas grandes e eternas amigas, Tânia Duarte, Inês Pita, Diana Maurício, Inês Sebastião, Joana Gomes, Mafalda Almeida, Inês Simões, Tatiana Martins, Catarina Marques, Margarida Coelho e Mafalda Costa, pela amizade incondicional, apoio, preocupação e interesse constantes, por todos os nossos momentos de convívio repletos de alegria. Às minhas amigas do coração, Andreia Diogo e Magda Santos, que apesar de distantes estão sempre presentes.

Aos meus queridos pais, irmão e cunhada, que sempre me apoiaram, obrigado pelo amor, dedicação, confiança, carinho e preocupação continuamente demonstrados.

Ao meu núcleo familiar, apesar de grande sempre muito unido, agradeço por ter estado sempre presente, pelo incentivo, preocupação e carinho que sempre demonstraram. Um agradecimento especial à minha prima e afilhada, Mariana, que esteve quase sempre comigo ao longo da elaboração desta dissertação e que, sem os seus abraços e incessante carinho, tudo seria mais difícil.

Ao Ivo pelo apoio, amor, paciência e incentivo contantes, por ter sempre uma palavra de motivação e de força nos momentos mais complicados.

RESUMO

Os tumores primários do fígado constituem um problema de importância global, uma vez que a sua incidência é crescente e as opções terapêuticas limitadas. Desta forma, torna-se imperativa a busca de novos alvos terapêuticos, assim como novas moléculas com potencial curativo para este tipo de tumores.

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor primário do fígado mais comum, onde a expressão do transportador de glicose 1 se encontra aumentada, induzindo a tumorigênese. De igual forma, no colangiocarcinoma (CC), o segundo tipo de tumor primitivo do fígado mais comum, tem sido igualmente sugerido que apresenta um aumento da expressão deste transportador, embora não existam ainda evidências acerca do seu potencial tumorigénico neste tipo de tumor.

Os flavonoides, como a quercetina, são inibidores competitivos do GLUT-1 e podem constituir potenciais agentes terapêuticos extremamente úteis em tumores primários do fígado. De facto, são vários os estudos, em diversos tipos de cancro onde se tem verificado o efeito anticancerígeno da quercetina.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito anticancerígeno e de indução de morte celular da quercetina, como também avaliar o possível efeito sinérgico com o sorafenib em três linhas celulares humanas de CHC que diferem entre si na expressão da p53 (HepG2 (expressa a forma normal da p53), HuH7 (expressa uma forma mutada da p53) e Hep3B2.1-7 (não expressa p53)) e numa linha celular humana de CC (TFK-1).

Em todas as linhas celulares em estudo demonstrou-se que a quercetina e o sorafenib apresentam eficácia ao nível da inibição da proliferação celular. Para além disso, foi possível verificar que ocorre sinergia no tratamento combinado destes dois compostos, para as linhas celulares de CHC, quando estes foram administrados simultaneamente. Em todas as linhas celulares, a quercetina induziu morte celular por apoptose, acompanhada de uma tendência para o aumento da razão Bax/Bcl-2 e aumento da paragem do ciclo celular na fase G0/G1 e na fase G2/M, verificando-se também uma diminuição da população em fase S. Para as linhas celulares de CHC, verificou-se um aumento da população em fase pré-G1. Foi possível verificar ainda as características anti-/pró-oxidantes da quercetina, havendo indicações de que o peróxido de hidrogénio possui um papel na toxicidade induzida por este composto. Os resultados

obtidos através da avaliação da expressão do GLUT-1 mostraram um aumento da expressão membranar deste transportador, acompanhado de uma diminuição citoplasmática do mesmo. Estes resultados entram em concordância com os resultados obtidos pelos estudos de captação de ^{18}F -FDG, que apontam para uma inibição competitiva por parte da quercetina, inibição esta que parece estar intimamente relacionada com o efeito anticancerígeno deste composto.

ABSTRACT

Primary liver tumors are a problem of global importance, since the incidence is increasing worldwide and therapeutic options are limited. Thus, it becomes imperative find new therapeutic targets as well as new molecules with therapeutic potential for this type of tumors.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver tumor, where expression of glucose transporter 1 (GLUT-1) is increased, leading to tumorigenesis. Cholangiocarcinoma (CC) is the second most common primary liver tumor and studies have demonstrated a higher expression of GLUT-1, however, there are no studies on the tumorigenic potential of GLUT-1 in this type or tumor.

Flavonoids, such as quercetin are competitive inhibitors of GLUT-1 and may be potential therapeutic agents extremely useful in primary liver tumor. In fact, the anti-cancer effect of quercetin, has been observed where in various types of cancer, by several studies.

So, the main objective of this study was the evaluation quercetin anticancer activity and induction of cell death effect, as well as the possible synergistic effect with sorafenib in three human HCC cell lines that differ in p53 expression (HepG2 (expressing the normal form of p53), Huh7 (expressing a mutated form of p53) and Hep3B2.1-7 (not express p53)) and a human CC cell line (TFK-1).

It was found that for all cell lines studied, quercetin and sorafenib have anti-proliferative effect. In addition, it was possible to verify that occurred synergy when the two compounds were added simultaneously for all HCC cell lines. In all cell lines, quercetin induced cell death by apoptosis, followed by an increase in Bax/Bcl-2 ratio and an arrest in the G0/G1 and G2/M phases of cell cycle. It was also verified a decrease in population S phase. For HCC cell lines, there was also an increase in the pre-G1 population. From the obtained results it was also observed the importance of pro/anti-oxidants characteristics of quercetin, indicating that hydrogen peroxide can have an active role in the toxicity induced by this compound. The results obtained by evaluating the GLUT-1 expression showed an increased expression of this transporter at membrane, accompanied by a decrease in cytoplasm. These results are consistent with the results obtained through ^{18}F -FDG uptake, which indicating a competitive inhibition

of GLUT-1 by quercetin, this inhibition appears to be intimately related to the anti-cancer effect of this compound.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	1
1.1. Tumores Primários do Fígado.....	3
1.2. Carcinoma Hepatocelular.....	3
1.2.1. Epidemiologia e Fatores de Risco	3
1.2.2. Alterações Moleculares e Genéticas	7
1.2.3. Diagnóstico e Tratamento	9
1.2.3.1. <i>Quimioterapia Sistêmica</i>	11
1.2.3.1.1. <i>Terapias Dirigidas</i>	12
1.2.3.2. <i>Radioterapia</i>	12
1.3. Colangiocarcinoma	13
1.4. Metabolismo Glicolítico e Cancro	14
1.4.1. GLUT-1 e Oncogênese do CHC.....	16
1.4.2. Tomografia por Emissão de Positrões	17
1.5. Flavonoides	19
1.5.1. Flavonóis	21
1.5.2. Ação Fisiológica dos Flavonoides.....	22
1.5.3. Quercetina.....	23
1.5.3.1. <i>Química</i>	23
1.5.3.2. <i>Farmacocinética</i>	24
1.5.3.3. <i>Propriedades Anticancerígenas</i>	25
1.6. Objetivos	28

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Culturas Celulares	33
2.2. Estudos de Citotoxicidade.....	34
2.2.1. Avaliação da Proliferação Celular pelo Ensaio do MTT.....	35
2.2.1.1. <i>Avaliação do Efeito da Combinação da Quercetina com o Sorafenib</i>	36
2.3. Avaliação da Sobrevivência Celular por Ensaio Clonogênico	37
2.4. Citometria de Fluxo.....	38
2.4.1. Avaliação da Viabilidade Celular e Tipos de Morte Celular Induzida	40
2.4.2. Avaliação da Expressão de Bax e Bcl-2	41

2.4.3. Avaliação do Ciclo Celular	43
2.4.4. Avaliação da Expressão Proteica de GLUT-1	44
2.4.4.1. Avaliação da Expressão Membranar de GLUT-1	44
2.4.4.2. Avaliação da Expressão Citoplasmática de GLUT-1	44
2.4.5. Avaliação da Produção Intracelular de Espécies Reativas de Oxigénio	45
2.4.5.1. Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos	45
2.4.5.2. Avaliação da Produção Intracelular de Radical Superóxido	46
2.4.5.3. Avaliação da Expressão Intracelular de Glutatião Reduzido	47
2.5. Estudos de Captação de ¹⁸ F-FDG	47
2.6. Análise Estatística	49

CAPÍTULO 3

RESULTADOS	51
3.1. Avaliação da Proliferação Celular pelo Ensaio do MTT	53
3.1.1. Quercetina	53
3.1.2. Sorafenib	57
3.1.3. Avaliação do Efeito da Combinação da Quercetina com o Sorafenib	60
3.2. Avaliação da Sobrevivência Celular pelo Ensaio Clonogénico	63
3.3. Citometria de Fluxo	65
3.3.1. Avaliação da Viabilidade Celular e Tipos de Morte Celular Induzida	65
3.3.2. Avaliação da Expressão de Bax e Bcl-2	68
3.3.3. Avaliação do Ciclo Celular	70
3.3.4. Avaliação da Produção Intracelular de Espécies Reativas de Oxigénio e Defesas Anti-Oxidantes	72
3.3.4.1. Produção de Peróxidos	72
3.3.4.2. Produção de Anião Superóxido	74
3.3.4.3. Produção de GSH Livre	75
3.3.5. Avaliação da Expressão Proteica de GLUT-1	77
3.4. Estudos de Captação de ¹⁸ F-FDG	79

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO	83
-----------------	-----------

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES.....101

BIBLIOGRAFIA.....**105**

ABREVIATURAS

¹⁸F-FDG	2-desoxi-2-(¹⁸ F)fluoro-D-glicose
5-FU	5-fluorouracilo
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABD	<i>ATP-binding domains</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB1	<i>Aflatoxin B1</i>
AFP	<i>α-fetoprotein</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AV	<i>Annexin V</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCLC	<i>Barcelona-Clinic Liver Cancer</i>
BCRA2	<i>Breast cancer 2</i>
CC	Colangiocarcinoma
CHC	Carcinoma hepatocelular
c-myc	<i>Myelocytomatosis c</i>
CO₂	<i>Carbon dioxide</i>
<i>cyclin D1</i>	<i>G1/S-specific cyclin D1</i>
DCF	<i>Dichlorodihydrofluorescein</i>
DHE	<i>Dihidroetidina</i>
DLC-1	<i>Deleted in liver cancer protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF1	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERK1	<i>Extracellular-signal-regulated kinase 1</i>
FADH₂	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS	<i>Forward scatter</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
G6-PI II	<i>Glucose-6-phosphate isomerase II</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GLUT's	<i>Glucose transporters</i>
GLUT-1	<i>Glucose transporter 1</i>
GLUT-3	<i>Glucose transporter 3</i>
GPI	<i>Glucose phosphate isomerase</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
H₂O	<i>Água</i>
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HG	<i>High glucose</i>
HK II	<i>Hexokinase II</i>
HK	<i>Hexokinase</i>
IC₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IGF-2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K_m	<i>Constante de Michaelis</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LG	<i>Low glucose</i>
MAP	<i>Microtubule-associated proteins</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MDR	<i>Multiple drug resistance</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein/extracelular signal-regulated kinase</i>
MIF	<i>Média de intensidades de fluorescência</i>
MRP-1	<i>Multidrug resistance-associated protein 1</i>
MRP-2	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>

MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
p73	<i>Tumor protein p73</i>
P-Akt	<i>Protein Kinase B phosphorilated</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDH	<i>Pyruvate dehydrogenase</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PFK	<i>Phosphofructokinase</i>
PGK	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
PGM	<i>Phosphoglycerate mutase</i>
P-gp	<i>P-glycoprotein</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PI3K	<i>Fosfatidilinositol 3-cinase</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
pp60^{v-src}	<i>Protein proto-oncogenic 60</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Raf	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
Ras	<i>Intracellular-signal protein</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RM	<i>Ressonância magnética</i>
ROS	<i>Reative oxigen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RTK	<i>Receptor tirosine kinase</i>
SGLT-1	<i>Sodium-glucose transport 1</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC's	<i>Solute carriers</i>
Smad2	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
Smad4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SOCS-1	<i>Supressoros cytokine signaling 1</i>
src	<i>Viral sarcoma gene</i>
SSC	<i>Side scatter</i>

TACE	<i>Transcatheter arterial chemoembolization</i>
TC	Tomografia computadorizada
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPI	<i>Triosephosphate isomerase</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
<i>β-catenin</i>	<i>Cateninadherin-associated</i>

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. TUMORES PRIMÁRIOS DO FÍGADO

Uma neoplasia pode ser considerada como uma diferenciação de células que se encontram presentes, normalmente, no tecido onde surge o tumor. Desta forma, neoplasias primárias e lesões semelhantes a tumores que ocorrem no fígado assemelham-se às células que constituem este órgão, em especial os hepatócitos, as células epiteliais biliares, as células endoteliais ou combinações destas com diversas células mesenquimais [1].

No fígado podem desenvolver-se tumores malignos primitivos ou primários, surgidos originalmente no órgão, assim como tumores malignos secundários, ou seja, metástases procedentes de um cancro localizado noutra órgão, como por exemplo, no pulmão ou na mama [1]. A maioria dos casos de cancro primário do fígado (cerca de 80%) são de carcinoma hepatocelular (CHC), sendo o colangiocarcinoma (CC) um outro tipo de cancro primário do fígado histologicamente e etiologicamente distinto do CHC, o segundo mais frequente (cerca de 10%). Para além destes, existem ainda outros tipos de cancro primário do fígado que representam a restante percentagem, tais como o angiossarcoma ou o hepatoblastoma [2].

1.2. CARCINOMA HEPATOCELULAR

1.2.1. EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

O carcinoma hepatocelular é um dos tipos de cancro mais letais em todo o mundo, sendo atualmente a terceira causa de morte por cancro a nível mundial e responsável por cerca de 695 mil mortes por ano [3-5]. É o quinto tipo de cancro mais comum nos homens (523 mil casos por ano, o que corresponde a 7,9%) e o sétimo mais comum nas mulheres (226 mil casos por ano, o que corresponde a 6,5%). Este carcinoma, quando é detetado, encontra-se na maioria das vezes já em estado bastante avançado, daí existir uma grande proximidade entre o número de casos diagnosticados e de morte, que traduz uma taxa de mortalidade muito elevada [4, 6].

A maioria dos casos de CHC (> 80%) ocorrem na África sub-Saariana e na Ásia de Leste, com taxas de incidência de mais de 20 casos por 100 mil indivíduos. Países do sul da Europa, como a Espanha, a Itália ou a Grécia tendem a ter níveis de incidência média (10-20 por 100 mil indivíduos), enquanto que a América do Norte e do Sul, a Europa do Norte e a Oceânia têm uma baixa incidência de CHC (< 5 por 100 mil indivíduos) (figura 1.1.).

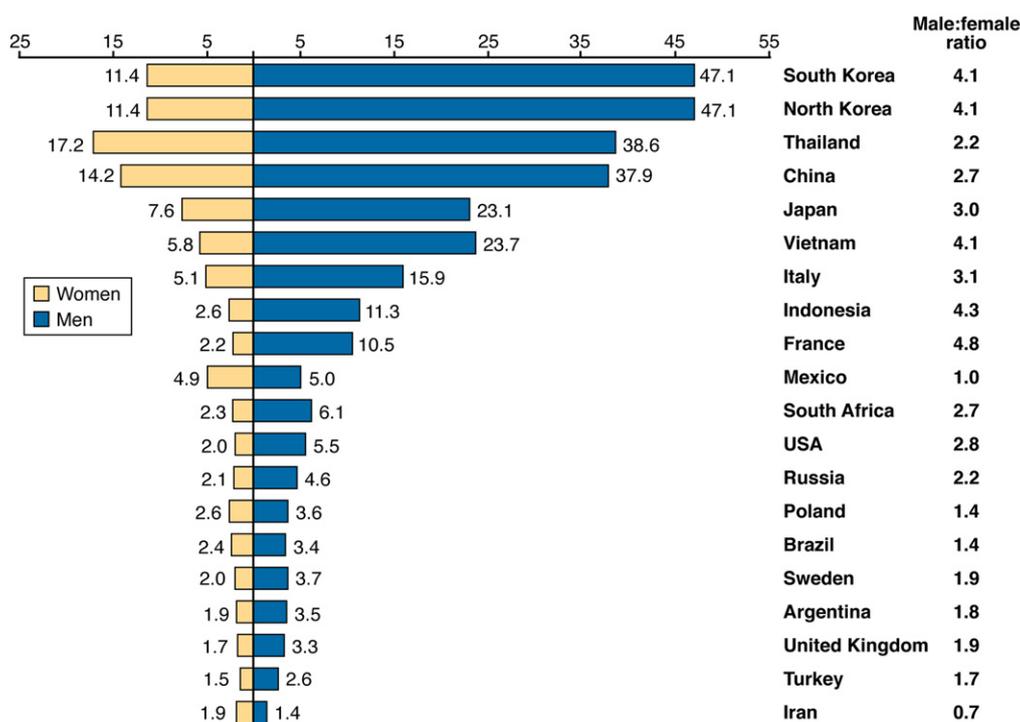


Figura 1.1.: Taxas de incidência de CHC nas diferentes regiões do mundo, por cada 100 mil indivíduos/ano e para os homens/mulheres [6].

Recentemente, tem-se verificado uma diminuição da incidência de CHC nas populações chinesas de Hong Kong, Xangai e de Singapura, assim como no Japão. No entanto, o número de casos de CHC tem vindo a aumentar em regiões de baixa incidência, como nos Estados Unidos e no Canadá [4, 6].

Este tipo de cancro ocorre, raramente, nas primeiras quatro décadas de vida, com exceção das populações onde a infeção pelo vírus da hepatite B, (VHB), é hiperendémica. A idade média de diagnóstico de CHC é de 55-59 anos na China e de 63-65 anos na Europa e na América do Norte. Em populações de baixo risco, observa-se uma elevada incidência de CHC a partir dos 75 anos de idade. Em contraste, na China, onde se encontra um dos maiores focos mundiais de CHC, as taxas de incidência

aumentam até aos 45 anos nos homens, estabilizando de seguida. Já nas mulheres, verifica-se um aumento até aos 60 anos [5, 6].

O CHC predomina no sexo masculino, observando-se uma elevada razão homem/mulher em regiões de elevada incidência, como se pode verificar na figura 1.1. [6]. Nos homens, o risco de CHC é 2 a 5 vezes maior do que nas mulheres, embora este varie por todo o mundo. Esta diferença é explicada por três motivos principais. Em primeiro lugar, os homens estão, normalmente, expostos a ambientes mais carcinogénicos para o fígado (como o tabaco e o álcool) e a infeções pelos vírus das hepatites. Em segundo lugar, na mulher os efeitos dos estrogénios podem suprimir a inflamação mediada pela interleucina-6, reduzindo o dano hepático e a proliferação compensatória. Em terceiro lugar, os efeitos da testosterona podem aumentar a sinalização do recetor de androgénios no homem, promovendo a proliferação das células do CHC [4].

A ocorrência de alterações nas taxas de incidência deste tipo de cancro reflete a alteração geográfica dos fatores de risco para o CHC. Assim, países com uma elevada prevalência de infeções por VHB e pelo vírus da hepatite C (VHC), possuem, normalmente, uma elevada incidência de CHC (Figura 1.2.). Esta observação é consistente com o facto de cerca de $\frac{3}{4}$ dos CHC's serem devidos a infeções crónicas por VHB e VHC [4].

De entre os fatores de risco, a infeção pelo VHB é a causa mais frequente do CHC, estimando-se cerca de 300 milhões de pessoas com infeção crónica por todo o mundo. Estudos controlo verificaram que portadores crónicos de VHB possuem um aumento de 5 a 15 vezes do risco de CHC, comparativamente com a população em geral. A grande maioria (entre 70% e 90%) dos carcinomas hepatocelulares causados por VHB surgem em doentes com cirrose, embora este tipo de vírus seja também considerado a causa mais conhecida para o aparecimento do CHC na ausência de cirrose [7].

A infeção crónica pelo VHC é também um fator de risco importante para o desenvolvimento do CHC. No entanto, torna-se difícil determinar a probabilidade de desenvolvimento da doença em pessoas infetadas por este vírus, devido à escassez de estudos a longo prazo, sendo a melhor estimativa de 1% a 3%, após 30 anos. O VHC aumenta o risco de CHC, promovendo o aparecimento de fibrose e, eventualmente, de cirrose. Deste modo, assim que a cirrose causada pela infeção do VHC se estabelece, o CHC desenvolve-se a uma taxa anual de 1 a 4% [7]. Os mecanismos subjacentes à

tumorígenese induzida por vírus associados a infeções por VHB e VHC ainda não estão esclarecidos, no entanto, sabe-se que estes tumores apresentam uma elevada instabilidade cromossómica [8].

Uma outra das causas da carcinogénese hepática é atribuída à cirrose hepática, associada tanto com a ingestão crónica de álcool como com a infeção por VHB e VHC, estando estes normalmente relacionados com a doença crónica do fígado [3-5]. Existem ainda outros fatores que contribuem para a carcinogénese deste tipo de tumor, como a obesidade, a diabetes, a esteatose hepática não-alcoólica e os fatores alimentares, como a ingestão crónica de álcool que, como já foi referido anteriormente, muitas vezes conduz à cirrose hepática [8-10].

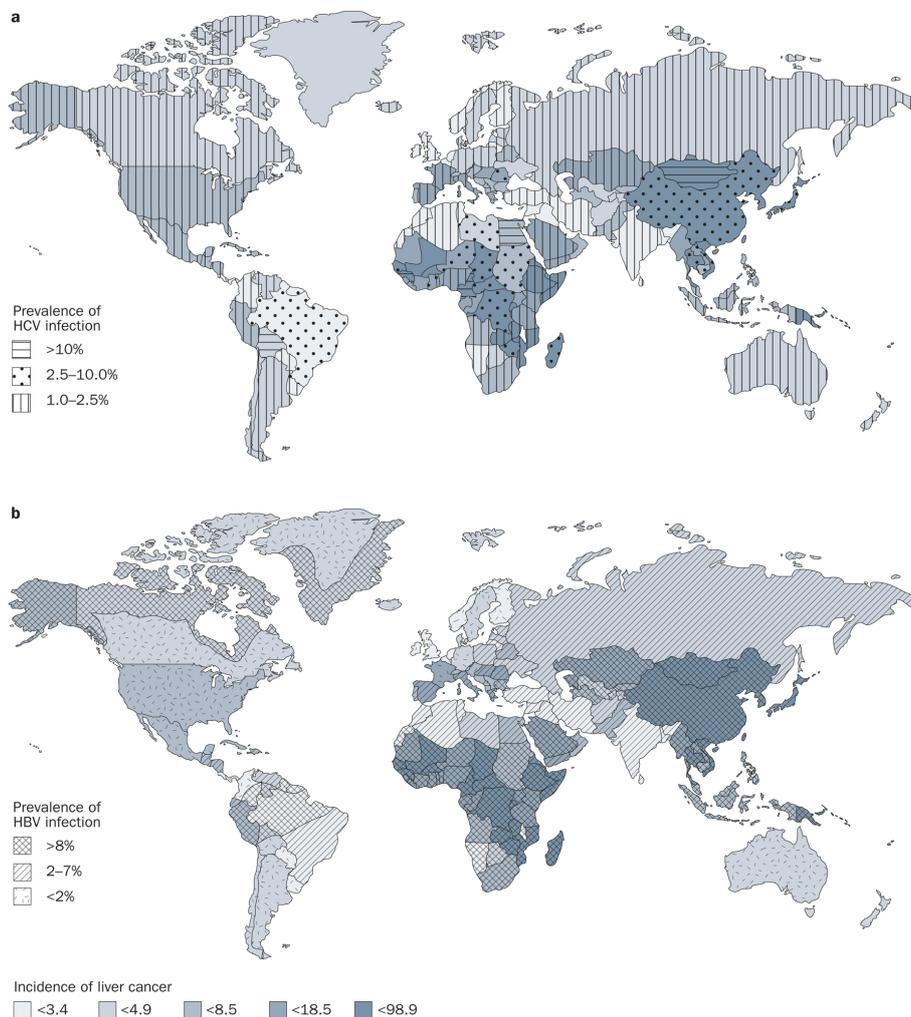


Figura 1.2.: Incidência mundial de CHC e prevalência de infeção crónica por VHB e VHC em diferentes áreas geográficas [4].

Em vários estudos, a diabetes tem surgido como um fator de risco para o CHC. Por sua vez, a obesidade encontra-se altamente relacionada com a diabetes, constituindo o fator de risco mais importante para esta última. Embora o mecanismo exato pelo qual a obesidade/diabetes conduz ao CHC não seja ainda conhecido, sabe-se que a inflamação hepática promove stresse oxidativo e peroxidação lipídica, o que secundariamente pode causar dano hepático, fibrose e, eventualmente, cirrose, sendo esta uma possível via para o mecanismo de desenvolvimento desta doença. A elevada incidência de CHC nos Estados Unidos deve-se, maioritariamente, à contribuição da obesidade/diabetes, pois cada vez mais os americanos, que apresentam elevado risco para esta doença são de uma elevada faixa etária, obesos e padecem de diabetes [2, 4].

Vários estudos têm evidenciado ainda que existe uma interação sinérgica entre a hepatite viral, o álcool e a diabetes, com consequências severas sobre o desenvolvimento do CHC [2].

A ingestão de alimentos que contêm micotoxinas, nomeadamente a aflatoxina B1 (AFB1), induz também o aparecimento de casos de CHC, como se verifica na Ásia e em África. A AFB1 consiste numa substância carcinogénica produzida pelo fungo da espécie *Aspergillus* que coloniza alimentos como o milho, o trigo, o amendoim e leguminosas [4, 11].

1.2.2. ALTERAÇÕES MOLECULARES E GENÉTICAS

Muito se sabe sobre o desenvolvimento e as causas do CHC. Normalmente, este desenvolve-se, como referido anteriormente, em ambiente cirrótico ou de hepatite crónica, no qual ocorre destruição de muitos hepatócitos, as células inflamatórias invadem o fígado e é depositado tecido conjuntivo. Estas alterações modificam, drasticamente, a matriz e o microambiente do fígado. As alterações hepatocelulares iniciais que precedem o aparecimento do CHC incluem focos de hepatócitos fenotipicamente alterados e, conseqüentemente, hepatócitos displásicos que induzem a formação de focos e nódulos (Figura 1.3.) [11].

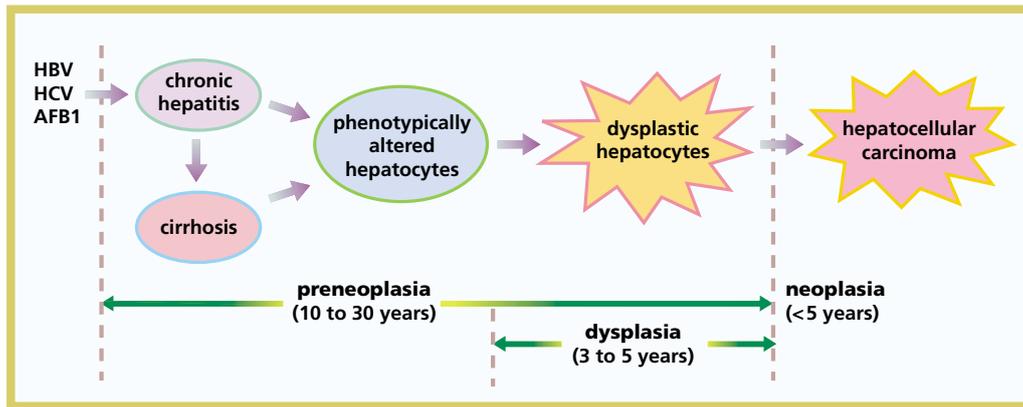


Figura 1.3.: Sequência cronológica de lesões celulares, culminando com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em humanos [11].

As células do CHC, a nível genético, são descritas como detentoras de alterações significativas em diversos cromossomas. Foram encontradas mutações em imensos genes e, conseqüentemente, alterações nas proteínas correspondentes. Nestas incluem-se a p16 (do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor*), a p53 (do inglês *tumor protein p53*), a p73 (do inglês *tumor protein p73*), o APC (do inglês *adenomatous polyposis coli*), o BRCA2 (do inglês *breast cancer-2*), o DLC-1 (do inglês *deleted in liver cancer protein*), o IGF-2 (do inglês *insulin-like growth factor-2*), a PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*), a Rb (do inglês *retinoblastoma protein*), a Smad2 (do inglês *mothers against decapentaplegic homolog-2*) e a Smad4 (do inglês *mothers against decapentaplegic homolog-4*), o SOCS-1 (do inglês *supressor of cytokine signaling-1*), o c-myc (do inglês *myelocytomatosis c*), a β -catenin (do inglês *catenin/cadherin-associated*) e a *cyclin D1* (do inglês *G1/S-specific cyclin D1*) [12].

A proteína p53 é uma fosfoproteína citoplasmática constituída por 393 aminoácidos e com um peso molecular de 53 kDa, sendo codificada por um gene (TP53) localizado no braço curto do cromossoma 17 (posição 17p13.1) [13].

As funções do gene TP53 como supressor tumoral revelam e destacam o papel central que este possui na regulação da ativação da transcrição de genes reguladores do crescimento, controlando a progressão do ciclo celular e da divisão celular. A proteína p53 está presente, normalmente, em baixas concentrações nas células. No entanto, a sua transcrição pode ser ativada por estímulos, tais como danos no ADN, hipóxia, proteínas virais, ou progressão desregulada do ciclo celular causada pela expressão oncogénica ectópica. A sobrerregulação da p53 tem como conseqüências biológicas a indução de vias que conduzem tanto a paragem do ciclo celular como a apoptose. Por sua vez,

mutações no gene TP53 revogam as suas funções normais, levando à ocorrência de instabilidade genómica e perda de controlo do crescimento. Muitos estudos têm demonstrado que a p53 se encontra, frequentemente, mutada no CHC. Embora a expressão alterada da p53 se correlaciona com o grau avançado do tumor, a progressão, a terapia e a sobrevivência, é facto que informações sobre a forma como as mutações no gene TP53 se encontram ligadas à recorrência do CHC são limitadas [14].

Existem inúmeros mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvidos no desenvolvimento do CHC, fatores que regulam a proliferação e a sobrevivência celular, fatores de crescimento e respetivos recetores, fatores angiogénicos e recetores de oncogenes. Um exemplo destes mecanismos é a sobreexpressão do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), com possível estimulação do recetor da tirosina cinase. Esta estimulação permite manter o recetor ativo e, desta forma, estimular a transdução a partir da membrana celular para o núcleo. Também outros mensageiros secundários permitem a transmissão de moléculas desde a superfície celular até ao núcleo, como é o caso da via das MAP (do inglês *microtubule-associated proteins*) cinases (MAPK), através da proteína Ras, ativada quando um fator de crescimento se liga a recetores na membrana. Após se autofosforilar, a proteína Ras transmite o sinal através da ativação de outros componentes da via de sinalização MAPK, tais como, as cinases ERK1, MEK e Raf [12].

Um outro mecanismo ativo no processo de proliferação tumoral no CHC é a angiogénese. Este processo permite o aumento do número de recetores requeridos para a cascata de sinalização da via das MAPK, contribuindo para a regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência das células tumorais. Para que ocorra o crescimento descontrolado de tumores, estes necessitam de fontes independentes de sangue e, conseqüentemente, de oxigénio, glicose e outros nutrientes. No carcinoma hepatocelular, o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) encontra-se particularmente ativo e expresso e, conseqüentemente, este tipo de tumor é altamente vascularizado [12, 15].

1.2.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O CHC não possui um tipo de tratamento específico, o prognóstico é muito pobre e a sobrevida diminuta. Anteriormente, grande parte dos casos de CHC eram

diagnosticados já num estágio bastante avançado da doença, não permitindo, deste modo, grandes opções terapêuticas. Em contrapartida, mais recentemente têm vindo a surgir enormes avanços na medicina, que possibilitam uma precoce e eficaz deteção do CHC [4, 7].

No que respeita ao diagnóstico de CHC, numa primeira fase, recorre-se a uma combinação de imagem médica (ecografia abdominal) com uma avaliação da presença da α -fetoproteína (AFP), um marcador tumoral presente no plasma. Embora a presença de AFP sérica seja o principal indício de CHC, esta apresenta uma baixa especificidade, tendo de se recorrer a novos exames após esta ser identificada. Depois de se verificar uma lesão ou nódulo anormal no doente através da ecografia, recorre-se a outras técnicas imagiológicas, designadamente a TC (tomografia computadorizada) e a RM (ressonância magnética), assim como ao estudo anatomopatológico realizada numa biopsia. Para definir qual a terapia mais correta a aplicar é necessário o conhecimento preciso do estágio da doença, existindo inúmeras classificações e diferentes planos de tratamento para o CHC, como por exemplo o algoritmo BCLC (*Barcelona-Clinic Liver Cancer*) [4].

Entre as opções terapêuticas disponíveis, o transplante hepático é a terapia mais eficaz, permitindo o tratamento simultâneo do cancro e da doença associada. Porém, apenas 5% dos doentes podem beneficiar do transplante, uma vez que, entre outros fatores, a disponibilidade e a compatibilidade dos órgãos constitui uma barreira a esta terapia [16-18]. No entanto, o transplante hepático continua a ser a terapia de eleição para doentes com CHC na fase inicial de cirrose descompensada. Em doentes com tumores isolados ≤ 5 cm, ou com até 3 nódulos (≤ 3 cm), é possível obter resultados idênticos entre eles para doentes transplantados, uma vez que a fase final de cirrose sem malignidade (70% em 5 anos) e a taxa de recorrência é menor do que com cirurgia. Após o transplante, podem surgir situações difíceis de controlar, tais como a rejeição do órgão transplantado ou a reinfeção viral e, no caso de reinfeção, 5 anos após a transplantação, 50% destes doentes apresentarão novamente clínica de cirrose [19].

Uma outra opção para estes tumores localizados é a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial, mas também neste caso, a sua concretização encontra-se restrita a um número reduzido de doentes, ou seja, aos que não apresentem doença hepática associada [16-18]. Com este perfil, os doentes poderão tolerar a ressecção de um segmento hepático sem danificar o fígado pela libertação de citocinas, assim como a reperfusão isquémica. A sobrevivência dos candidatos a esta terapia pode exceder os

60%-70% ao fim de 5 anos, no entanto, a elevada taxa de recorrência da doença durante o acompanhamento (>50% em 3 anos) constitui a principal desvantagem. Esta taxa de recorrência pode dever-se à transmissão por via hematogénica ou à formação *de novo* do tumor, onde a presença de invasão vascular ou de nódulos adicionais constituem ótimos indicadores de recorrência por disseminação [19].

Existem outras terapias a que os doentes não candidatos a transplante e a hepatectomia parcial podem recorrer, como a ablação percutânea, que possibilita uma cura a curto prazo. As técnicas mais frequentes para ablação de tumores por meios físicos são a injeção transcutânea de etanol e a remoção por radiofrequência [17, 18, 20, 21]. Ambas as técnicas são feitas sob a orientação de imagem, sendo a sua atividade máxima alcançada para os nódulos com diâmetros inferiores a 3cm, casos em que as taxas de resposta completa correspondem a cerca de 80%. A principal desvantagem consiste novamente na elevada taxa de recorrência da doença, que se for locorregional ou local, significa que não houve uma ressecção conveniente [19]. Também a crioablação e a quimioembolização trans-arterial (TACE) são procedimentos terapêuticos indicados para o tratamento do CHC. A TACE permite doses elevadas de quimioterapia localizada, isto é, envolve a injeção de um fármaco citotóxico misturado com lipiodol seguido por embolização com recurso a partículas absorvíveis, induzindo respostas objetivas de 16% a 55% dos doentes, com conseqüente redução da taxa de progressão do tumor [17, 18, 20, 22-24].

Ainda como opções terapêuticas, embora com fracos resultados e normalmente em casos paliativos, temos também a quimioterapia e/ou a radioterapia.

1.2.3.1. Quimioterapia Sistémica

O CHC é classificado como um tumor altamente quimiorresistente, sendo mínima a eficácia da quimioterapia sistémica. Embora a doxorubicina sistémica seja um dos agentes mais utilizados na prática clínica, permite uma resposta parcial em menos de 10% dos doentes, sem aumentar a sobrevivência global. Por outro lado, a administração de 5-fluorouracilo (5-FU) é controversa, embora seja defendida por alguns autores, sendo por exemplo utilizado em combinação com outros fármacos [25].

Outros agentes convencionais, como a cisplatina, a mitoxantrona, o ectoposídeo, a fludarabina, o placlitaxel, o irinotecano, a gemcitabina e a capecitabina, tanto em terapia

isolada como em quimioterapia combinada, têm vindo a ser utilizados no CHC, com resultados igualmente decepcionantes. Desta forma, o papel da quimioterapia no CHC é principalmente paliativo e envolve o controlo dos efeitos do crescimento do tumor e a minimização dos sintomas que dele advêm [15, 25-30].

Estudos recentes demonstraram que as alterações moleculares no carcinoma hepatocelular induzem um desequilíbrio na regulação da apoptose e, conseqüentemente, resistência à quimioterapia [25-29]. No CHC a expressão de algumas proteínas pró-apoptóticas, tais como a Bax (do inglês *Bcl-2 associated X protein*) está diminuída e a expressão de algumas proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*) está aumentada. Deste modo, o equilíbrio entre a morte e a sobrevivência celulares encontra-se desregulado. Além disso, como foi referido anteriormente, é frequente, em células deste tipo de tumor, a ocorrência de alterações da expressão e/ou ativação da p53, o que acessoriamente pode conferir resistência aos fármacos utilizados em quimioterapia [15, 25-30].

1.2.3.1.1. Terapias Dirigidas

Mais recentemente, especificamente nos últimos 20 anos, têm sido desenvolvidas terapêuticas dirigidas a alvos moleculares. Dentro deste tipo de fármacos, o sorafenib, fármaco que é um inibidor multiquinase, tem vindo a ser utilizado na prática clínica em doentes com CHC avançado. Este fármaco foi aprovado em 2007 e tem-se verificado um aumento significativo do tempo de sobrevida dos doentes com CHC, de 7,9 a 10,7 meses, sem efeitos colaterais adversos. A eficácia antitumoral do sorafenib foi alcançada, principalmente, por reduzir a progressão radiológica (de 2,8 a 5,5 meses), tornando este fármaco o melhor fármaco utilizado, hoje em dia, no tratamento sistémico deste tipo de tumores [15].

1.2.3.2. Radioterapia

Apesar de desempenhar um papel menor, também a radioterapia pode ser usada como tratamento do CHC. No entanto, o fígado, assim como os tumores primários deste órgão são considerados altamente radorresistentes [31]. Para além disso, a ineficácia

desta terapia poderá dever-se também à heterogeneidade existente entre os diferentes tipos de CHC. Muitas vezes, estes tumores variam entre si geneticamente, como já foi referido, na expressão do gene supressor tumoral (TP53) e de outros genes e proteínas envolvidos nas vias de morte e de proliferação celular, o que poderá estar também na base da resistência/sensibilidade associada à radioterapia [28, 31, 32].

Neste sentido, torna-se necessário investigar novas terapias biológicas e farmacológicas para este tipo de tumor. Assim, a terapia génica tem vindo a ser estudada exaustivamente como uma nova abordagem para o tratamento do CHC. É neste contexto que o transportador da glicose 1 (GLUT-1 do inglês *glucose transporter-1*) aparece equacionado como novo alvo terapêutico para este tipo de tumor extremamente agressivo.

1.3. COLANGIOCARCINOMA

O colangiocarcinoma (CC) é um tumor maligno que tem origem nas células epiteliais da árvore biliar [33]. Estudos epidemiológicos revelaram uma elevada incidência deste tipo de tumor hepático nos países ocidentais sendo, por exemplo, a incidência nos Estados Unidos de um a dois casos por 100.000 doentes, com idades superiores a 65 anos. Sabe-se também, que o CC é mais frequente em homens do que em mulheres (60-70%) [34].

No que se refere ao prognóstico, numa fase avançada da doença, o CC é tido como um tipo de cancro devastador, com uma sobrevida média menor que 24 meses. O único tratamento curativo possível é a ressecção cirúrgica ou transplante hepático, no entanto, a maioria dos doentes apresentam a doença num estado demasiado avançado, não sendo possível este tipo de terapias. Nestas condições os doentes são, na maioria das vezes, conduzidos para quimioterapia, embora esta tenha, na maior parte dos casos, um papel meramente paliativo [34-36].

A morte por CC decorre, normalmente, por insuficiência hepática ou complicações infecciosas que acompanham o avanço da obstrução biliar [35].

Anatomicamente, o CC é classificado em intra-hepático ou periférico se surgir dentro do fígado, em hilar se surgir na confluência dos ductos hepáticos direito e esquerdo e em extra-hepático se surgir entre a ampola hepatopancreática (ampola de Vater) e o hilo hepático. Os colangiocarcinomas hilares causam icterícia obstrutiva precoce e são, tipicamente, pequenos quando são detetados. Os tumores dos ductos extra-hepáticos podem ser ligeiramente maiores, mas são detetados ainda relativamente pequenos. No entanto, os tumores intra-hepáticos podem tornar-se de grandes dimensões, antes mesmo de serem detetados. Histologicamente, os diferentes tipos de tumores são muito semelhantes [34-36].

Etiologicamente, o CC pode estar associado a doenças inflamatórias e a malformações dos canais biliares, no entanto, na maioria dos casos, a etiologia é desconhecida. Por outro lado, sabe-se que o aparecimento de CC ocorre principalmente em áreas com elevadas taxas de infecção por vermes no fígado. No nordeste da Tailândia, onde estas infecções são endêmicas, cerca de 90% dos casos de cancro primário de fígado são colangiocarcinomas [2].

1.4. METABOLISMO GLICOLÍTICO E CANCRO

O transporte de nutrientes e iões através da superfície das células é assegurado pelos transportadores de solutos (SLC do inglês *solute carriers*), sendo fundamentais para o metabolismo celular. A ocorrência de modificações na expressão deste tipo de transportadores, bem como na atividade de transporte durante a carcinogénese tem vindo a ser associada com a elevada necessidade de nutrientes pelas células cancerígenas [37, 38].

A glicólise consiste numa sequência de reações enzimáticas que ocorrem no citoplasma das células, onde a molécula de glicose (com seis carbonos) é clivada e transformada, dando origem a duas moléculas de piruvato (com três carbonos) e duas moléculas de ATP. Cerca de uma dezena de enzimas estão envolvidas na glicólise, através da catálise de reações de fosforilação e desfosforilação, isomerização, clivagem aldólica, oxidação-redução e desidratação (Figura 1.4.). O piruvato produzido na via glicolítica pode ser catabolizado aerobiamente no complexo piruvato desidrogenase e no

ciclo do ácido cítrico, produzindo moléculas transportadoras de elétrons ($\text{NADH}+\text{H}^+$ e FADH_2), que permitem a produção de grandes quantidades de ATP, ao nível da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Neste sentido, dá-se a oxidação da glicose produzindo-se CO_2 , H_2O e ATP. Por outro lado, a glicólise pode dar-se também num ambiente sem oxigénio (anaeróbio), onde o piruvato pode ser convertido em outras moléculas mais reduzidas, como o lactato e o etanol [37-39].

O aumento de glicólise aeróbia e a dependência da síntese de ATP pela via glicolítica (efeito de Warburg) consiste numa das alterações metabólicas mais importantes das células cancerígenas. Esta conversão de glicose em lactato na presença de oxigénio é mediada pelo transporte de glicose e por hexoses. Por outro lado, é sabido que nas membranas celulares das células tumorais existe uma maior expressão e atividade dos GLUT's, os transportadores de glicose [37-39].

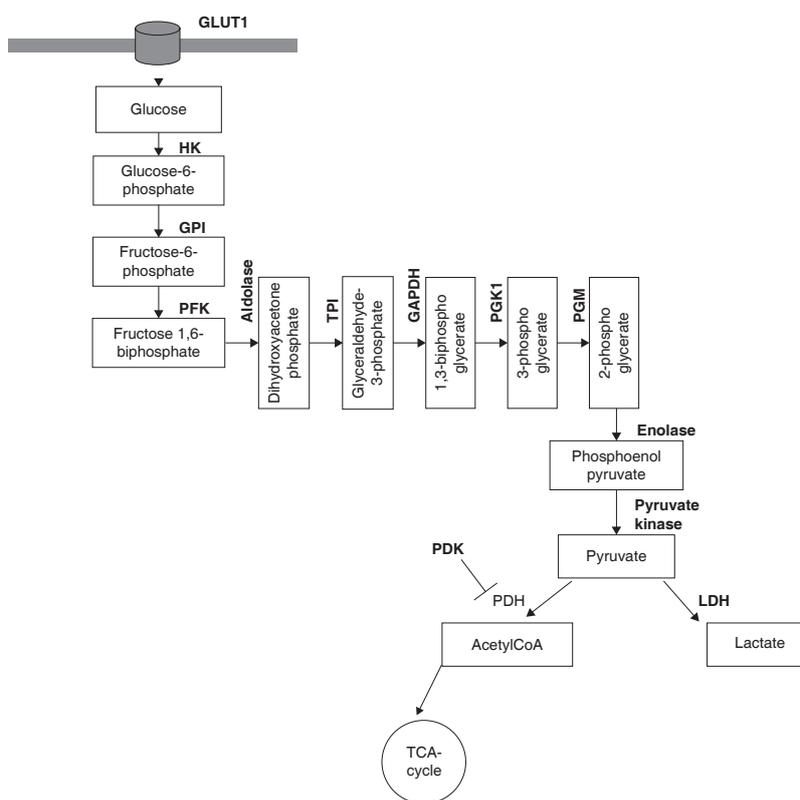


Figura 1.4.: Via metabólica da glicólise. GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GLUT-1: transportador de glicose 1; GPI: isomerase de fosfato de glicose; HK: hexocinase; LDH: lactato desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; PFK: fosfofrutocinase; PGK: fosfoglicerato cinase; PGM: fosfoglicerato mutase; TCA: ácido tricarbóxico; TPI: isomerase triosefosfato [38].

1.4.1. GLUT-1 E ONCOGÊNESE DO CHC

O GLUT-1 (transportador de glicose-1) é encontrado em quase todos os tecidos, apresentando diferentes níveis de expressão nos diferentes tipos de células. Geralmente, a expressão relaciona-se com a taxa de metabolismo celular da glicose. Este transportador é altamente expresso nos eritrócitos e no sangue, em particular nas células endoteliais que formam a barreira hematoencefálica, onde facilita a entrada de D-glicose através desta. Além disso, o GLUT-1 interage com outros transportadores de glicose mediando o seu transporte em astrócitos e neurónios [37].

O GLUT-1 transporta glicose de acordo com uma constante de Michaelis (K_m) de, aproximadamente, 3 mM, concentração de substrato à qual a velocidade de reação atinge metade do seu valor máximo. Também ocorre o transporte de outros substratos, tais como a galactose (K_m 30 mM), a manose (K_m 11 mM) e a glucosamina (K_m 2,1 mM). O gene do GLUT-1 está localizado no cromossoma 1 p35-p31.3, sendo composto por cerca de 35.000 pares de bases distribuídos por 10 exões. A proteína GLUT-1 encontra-se glicosilada, detetando-se concentrações elevadas da sua forma mais glicosilada (55 kDa) na barreira hematoencefálica. Uma forma menos glicosilada (45 kDa) está presente no parênquima, nomeadamente, nas células da glia. Este transportador é uma proteína de ligação nucleotídica com três domínios de ligação a ATP, dois no folheto interno e um no folheto externo da membrana celular, domínios estes importantes para a sua conformação e afinidade (Figura 1.5.). A glicose é retida pelos domínios citosólicos do GLUT-1, após ocorrer ligação de ATP nestes. O seu mecanismo de ativação é dependente de pH, podendo ser esta a razão pela qual níveis reduzidos de ATP conduzem à ativação do GLUT-1 em condições de hipóxia [37, 38].

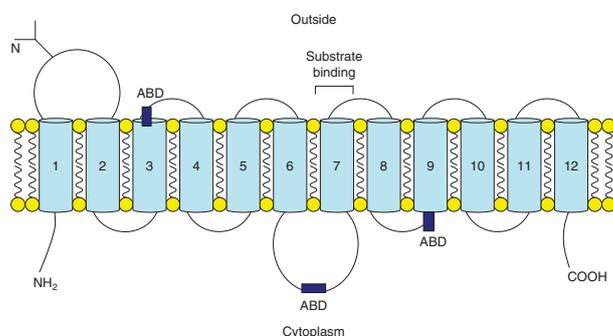


Figura 1.5.: Modelo esquemático da orientação do GLUT-1 na membrana celular. Os domínios transmembranares encontram-se numerados de 1 a 12. Estão identificados o local de glicosilação (N) e os domínios de ligação a ATP (ABD) [38].

A sobre-expressão de GLUT-1 e o elevado metabolismo de glicose estão presentes em abundância numa ampla variedade de tumores sólidos conferindo-lhes, na maioria das vezes, um mau prognóstico. O fígado está intimamente relacionado com o metabolismo do glicogénio, sugerindo-se que a expressão do GLUT-1 pode estar alterada em tumores primários do fígado [37-39].

Alguns estudos indicam que o GLUT-1 se encontra, de facto, sobre-expresso no CHC, promovendo a tumorigénese. Para além disso, num estudo de 2009 demonstrou-se que suprimindo a expressão de GLUT-1, recorrendo a siRNA (*small interfering RNA*) se reduziu significativamente a tumorigénese em culturas celulares de CHC. Estes resultados sugerem que o GLUT-1 desempenha um papel direto na oncogénese desta neoplasia, podendo ser um alvo terapêutico para este tipo de tumor altamente agressivo [37-39].

Outros estudos demonstraram uma ligação entre a resistência à quimioterapia e a expressão de GLUT-1, especialmente relacionada com a resistência à apoptose. Como já foi referido, sabe-se que a resistência à apoptose está relacionada com uma desregulação entre a expressão das proteínas pró e antiapoptóticas. O gene supressor tumoral TP53 é um fator que também pode estar envolvido neste processo de resistência, uma vez que, dentro das suas várias funções intracelulares, se destaca a da regulação do ciclo celular. Deste modo, a p53 constitui um fator chave na indução de apoptose em resposta à radioterapia e quimioterapia no CHC, na medida em que as mutações no seu gene são as alterações mais comuns observadas nos tumores primários de fígado. Assim, uma combinação entre inibidores do GLUT-1 e agentes de quimioterapia pode fornecer uma nova estratégia terapêutica para superar a resistência aos fármacos citotóxicos utilizados em quimioterapia [37-39].

No que diz respeito à relação entre CC e GLUT-1, existem estudos que evidenciam uma maior expressão deste transportador no CC do que no CHC, no entanto, nada se sabe acerca do potencial tumorigénico do GLUT-1 no colangiocarcinoma. É neste sentido que se torna imperativo o estudo deste marcador como um possível alvo terapêutico neste tipo de tumor altamente agressivo [40, 41].

1.4.2. TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES

A Tomografia por Emissão de Positrões (PET do inglês *Positron Emission Tomography*), com recurso ao análogo radiomarcado da glicose, a glicose 2-desoxi2-

(^{18}F)fluoro-D-glicose (^{18}F -FDG), é uma técnica de imagiologia médica não-invasiva que permite a deteção de processos de glicólise hiperativos. Esta técnica de imagiologia é, sem dúvida, a mais utilizada para estudar o metabolismo da glicose das células cancerígenas em pessoas [42].

Na molécula de ^{18}F -FDG, o isótopo radioativo emissor de positrões ^{18}F substitui o grupo hidroxilo na posição C2 na molécula de glicose. O ^{18}F -FDG entra nas células através dos transportadores de glicose (GLUT's), principalmente através do GLUT-1 e do GLUT-3 [42]. A nível intracelular, o ^{18}F -FDG é fosforilado pela hexoquinase II (HK II) a ^{18}F -FDG-6-fosfato, por um processo semelhante ao que acontece com a glicose. No entanto, devido ao átomo de flúor-18 que se encontra na posição C2, a ^{18}F -FDG-6-fosfato não é metabolizada na via glicolítica ao contrário do que acontece com a glicose, evitando a sua degradação. Além disso, verifica-se uma atividade muito baixa da enzima glicose-6-fosfatase, que catalisa a desfosforilação da glicose-6-fosfato, nas células tumorais. Como a membrana celular é impermeável à ^{18}F -FDG fosforilada, a ^{18}F -FDG-6 fosfato acumula-se no interior das células metabolicamente ativas [43].

Contrariamente à glicose, a ^{18}F -FDG não é substrato para os transportadores existentes nos túbulos renais, pelo que não é aí reabsorvida depois da filtração glomerular, sendo excretada pela urina. Tal facto contribui para uma libertação rápida através da corrente sanguínea, o que se torna muito importante na obtenção de imagens dos tecidos metabolicamente ativos. A Figura 1.6. representa um esquema do mecanismo de captação de ^{18}F -FDG [43].

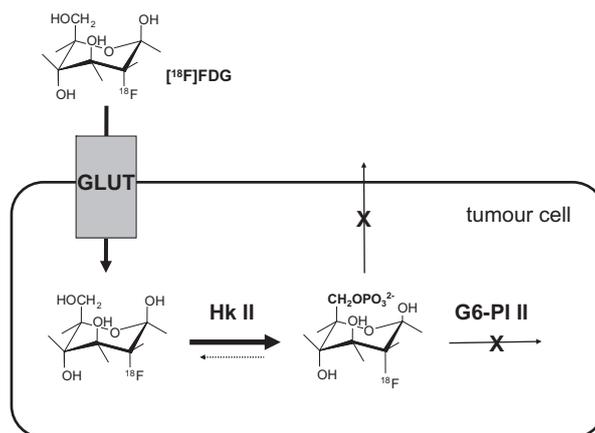


Figura 1.6.: Representação esquemática do mecanismo de captação da ^{18}F -FDG. A ^{18}F -FDG é transportada para a célula através de transportadores de glicose (GLUT's). Na célula a ^{18}F -FDG é fosforilada pela hexoquinase II (HK II). A introdução da carga negativa através do grupo fosfato é responsável pela retenção intracelular. Devido à falta do grupo hidroxilo na posição 2, a ^{18}F -FDG-6-fosfato não é reconhecida pela glicose-6-fosfato-isomerase II (G6-PI II) [43].

No entanto, ao mesmo tipo histológico de tumor poderão corresponder diferentes captações de ^{18}F -FDG, resultando na existência de uma grande variação nos valores de sensibilidade e especificidade da técnica [38, 42]. Diversos estudos têm demonstrado que a captação de ^{18}F -FDG se encontra relacionada com a expressão da proteína p53 em diversas linhas celulares de CHC [38, 44]. Por outro lado, em células em cultura, verificou-se uma maior captação do análogo radioativo da glicose pelas células deficientes em p53 relativamente a células que expressam esta proteína, as quais apresentaram uma baixa captação de ^{18}F -FDG [44, 45]. Em resumo, diferentes tumores possuem diferentes captações do radiofármaco ^{18}F -FDG, o que poderá estar intimamente correlacionado com as diferenças existentes na expressão de GLUT's de cada célula tumoral e com o perfil genético das mesmas [38].

Assim, o GLUT-1 além de ser um alvo terapêutico promissor, permite ajudar na compreensão da natureza tumoral e na sua relação com a resposta às terapias convencionais. Por outro lado, através da PET com ^{18}F -FDG é possível avaliar o estágio em que a doença se encontra, o que auxilia na escolha da terapêutica a adotar e também na monitorização da resposta à mesma [42, 43].

1.5. FLAVONOIDES

O efeito antitumoral dos flavonoides tem sido estudado, com o intuito de induzir a apoptose e de inibir o crescimento celular numa ampla variedade de células tumorais [46].

Os flavonoides são compostos polifenólicos presentes nas frutas, verduras e bebidas. A estrutura primária dos flavonoides (Figura 1.7.) consiste em dois grupos de carbono aromático, o benzopirano (anéis A e C) e o benzeno (anel B) [47, 48].

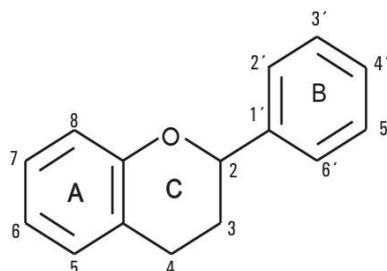


Figura 1.7.: Estrutura básica dos flavonoides. A estrutura básica dos flavonoides é composta por grupos benzopirano (anéis A e C) e benzeno (anel B) [48].

A variação no anel-C heterocíclico dos flavonoides e a interligação entre os grupos benzopirano e benzeno constituem a base para a classificação dos flavonoides em flavonas, flavonóis, flavononas, isoflavonas, antocianidinas e catequinas (Figura 1.8.).

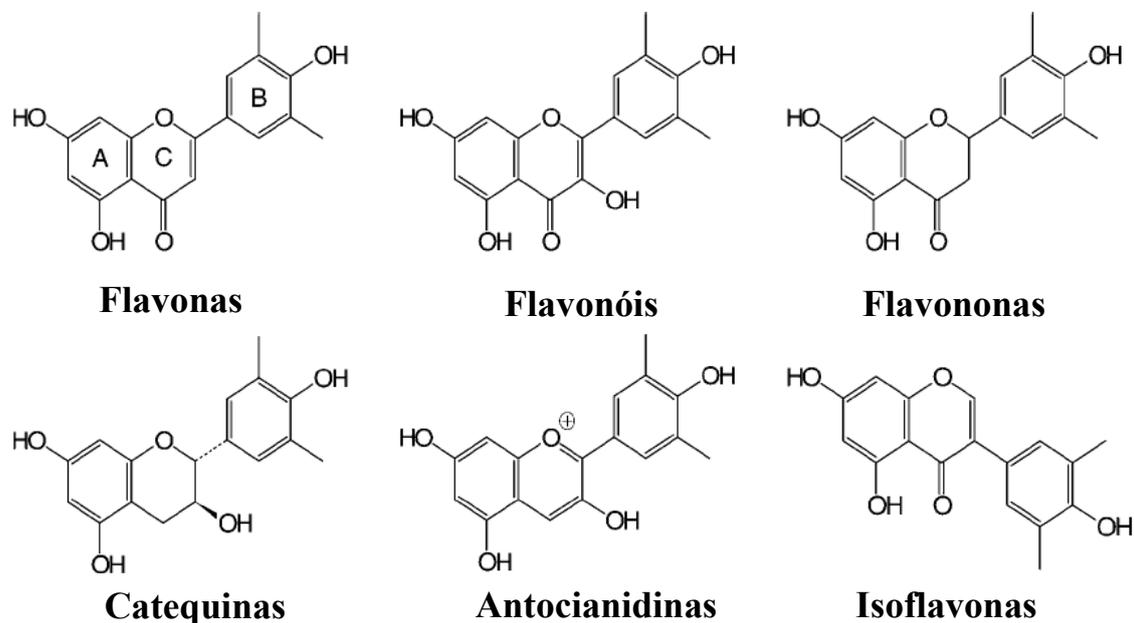


Figura 1.8.: Estrutura dos flavonoides. A classificação destas subclasses de flavonoides baseia-se nas variações no anel-C heterocíclico [48].

Os flavonoides apresentam diversos efeitos biológicos na saúde humana. *In vitro*, os flavonoides foram descritos como redutores da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL do inglês *low density lipoprotein*), como indutores e inibidores de enzimas e como indutores da eliminação de espécies reativas de oxigénio diminuindo, assim, o risco de doenças crónicas como são exemplo as doenças cardiovasculares e cancro. Alguns estudos têm demonstrado que os flavonoides, especialmente os flavonóis e as agliconas (pertencentes à classe das isoflavonas), inibem a captação de glicose. Têm surgido dados que mostram que alguns flavonoides, de facto, bloqueiam a captação de glicose nas células afirmando, deste modo, que os flavonoides podem ser usados como bloqueadores da captação de glicose, *in vitro* [48].

Para além destas características, possuem diversas atividades biológicas, nomeadamente atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e, como já foi referido, atividade anticancerígena e atividade que previne a doença cardiovascular. Estas ações biológicas surgem como resultado de alterações na atividade de diferentes

enzimas intracelulares, incluindo as tirosinas cinases, a proteína cinase C (PKC), a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK). Diversos estudos demonstraram também que os flavonoides podem alterar a captação de glicose estimulada por insulina através da modulação do recetor de tirosina cinase (RTK) e/ou através da atividade da PI3K em células do músculo ou do tecido adiposo [47-49].

1.5.1. FLAVONÓIS

Os flavonóis, uma subclasse dos flavonoides, são substâncias polifenólicas cuja estrutura química permite ter uma infinidade de padrões de substituição nos anéis benzénicos e heterocíclicos surgindo, assim, diferentes subgrupos. Os flavonóis mais importantes na dieta humana são a quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona), o kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxi-flavona), a myricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxi-flavona), a luteolina (5,7,4'-trihidroxi-flavona) e a apigenina (5,7,4'-trihidroxi-flavona). A sua estrutura base difenil-propano (C₆-C₃-C₆) permite-lhes inúmeros padrões de substituição nos anéis benzénicos 2 e no anel heterocíclico, originando subgrupos que diferem entre eles de acordo com a presença ou ausência de ligações duplas no anel-C, com a orientação do anel-B e com a ausência de oxigénio na posição 4. Deste modo, estas estruturas podem atuar através da eliminação de radicais livres, prevenindo os danos celulares oxidativos, da ativação das fases I e II dos sistemas enzimáticos de desintoxicação, estimulando a apoptose através da toxicidade mitocondrial assim como do colapso do potencial membranar mitocondrial. Por conseguinte, a regulação dos sistemas de transdução de sinal levam à formação de radicais livres na presença de peroxidases que, por sua vez, levam à fragmentação do ADN estimulando a resposta imunitária à malignidade, inibindo a angiogénese e modulando as vias das hormonas esteroides [48, 49].

Alguns estudos têm sugerido que o equilíbrio entre os efeitos estrogénicos e antiestrogénicos, pró e antioxidantes, anti e pró-proliferativos dos flavonoides baseiam-se numa relação estrutura-atividade que depende das substituições que ocorrem no anel difenil-propano. Por exemplo, os flavonóis com anéis-B fenólicos (p. e., apigenina) quando oxidados por peroxidases formam radicais fenoxílicos e originam espécies reativas de oxigénio, semelhante ao que acontece com diversos agentes

quimioterapêuticos, mostrando uma maior atividade que os radicais semiquinonas que advêm da peroxidação de flavonóis com anéis-B catecóis [49].

1.5.2. AÇÃO FISIOLÓGICA DOS FLAVONOIDES

Como já foi referido anteriormente, sabe-se que os flavonoides e os isoflavonoides são potentes inibidores do influxo de glicose [50]. Neste sentido, tem vindo a ser estudada a ação destas substâncias como inibidores do GLUT-1. Como já foi referido acima, este transportador de glicose possui três domínios de ligação de ATP, que são essenciais para a sua conformação e afinidade. Deste modo, estes locais de ligação de ATP parecem ser um alvo possível para estratégias farmacológicas, que resultam no bloqueio do GLUT-1. Atualmente, tem-se demonstrado que as flavonas, como a genisteína e a quercetina, inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP, sendo capazes também de inibir o GLUT-1 através deste mecanismo [38].

A atividade tirosínica específica da proteína cinase encontra-se associada a produtos oncogénicos da família do gene retroviral *src*, bem como com o papel dos retrovírus no processo de transformação celular. Verificou-se que em proteínas mutadas com atividade de tirosina cinase reduzida a eficiência na transformação celular é menor, enquanto que em proteínas mutadas que não possuem este tipo de atividade a transformação já se torna incompleta. Certos recetores celulares para diversos fatores de crescimento também apresentam atividade cinase semelhante, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF1 do inglês *epidermal growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF do inglês *platelet derived growth factor*), a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1 do inglês *insulin-like growth factor I*). Portanto, é possível verificar que a fosforilação tirosínica desempenha um papel extremamente importante na proliferação e transformação celular. Neste sentido, um inibidor específico da tirosina cinase pode ser considerado um agente antitumoral, constituindo uma ferramenta essencial para a compreensão do papel fisiológico deste tipo de fosforilação. Vários compostos têm sido descritos como inibidores da atividade de tirosina cinases, entre eles encontram-se os flavonóis, tais como a quercetina. Este flavonol além de inibir a atividade tirosínica cinase da proteína proto-oncogénica 60 (pp60^{v-src}), também permite a inibição das atividades de proteína cinase independente de cAMP, da proteína cinase C (PKC) dependente de

Ca²⁺/fosfolípido, da cinase fosforilase e das bombas Na⁺/K⁺-ATPase e Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase [51, 52].

1.5.3. QUERCETINA

A quercetina [2-Phenyl4*H*-1-benzopyran4-one, 2-Phenylchromone] é um flavonoide bioativo, do tipo flavonol, ubiquamente presente em frutas e legumes, como as maçãs, os frutos vermelhos, a cebola e o chá. Este flavonoide apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e vasodilatadores, tendo sido proposto como um potencial agente anticancerígeno. Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos, na Europa e na Ásia têm estimado uma ingestão diária de quercetina de cerca de 4 a 68 mg por indivíduo [52, 53]. Recentemente, nos Estados Unidos, a quercetina tem sido comercializada principalmente como complemento dietético [52].

1.5.3.1. Química

Como já foi referido anteriormente, os flavonoides caracterizam-se por possuírem dois anéis benzeno (A e B) ligados a um anel pireno que contém oxigénio. Os três anéis são planares e a molécula é relativamente polarizada, sendo observadas três pontes de hidrogénio intermoleculares (duas com o grupo carbonilo e outra entre os grupos hidroxilo no anel B). A fórmula empírica da quercetina é C₁₅H₁₀O₇, possuindo um peso molecular de 302,24 g/mol (Figura 1.9.).

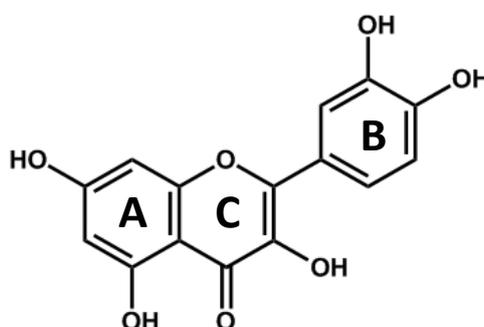


Figura 1.9.: Estrutura molecular da quercetina [48].

Na dieta, a quercetina está presente, maioritariamente, sob a sua forma de um glicosídeo, no qual um ou mais grupos de açúcar estão associados aos grupos fenólicos por ligação glicosídica. A sua solubilidade em água aumenta com o aumento do número de grupos de açúcar. A quercetina é estável em urina e plasma humanos, em acetonitrilo e em água a 4 °C, -20 °C e -80 °C. Em condições básicas, a instabilidade verificada pela quercetina é, provavelmente, devida à instabilidade da estrutura do anel central desta, resultando na fragmentação dessa estrutura. Portanto, a estrutura do anel central da quercetina parece ser essencial para sua estabilidade [52].

Através de análises de relações estrutura-atividade verificou-se que as propriedades físicas da quercetina são determinadas pela sua estrutura química. Este flavonoide pode participar em reações complexas com metais, afetando o transporte, a reatividade, a biodisponibilidade e a toxicidade dos iões metálicos. Tem disponíveis três possíveis locais de quelatação, que podem ser classificados da seguinte forma: catecol > α -hidroxicarbonilo > β -hidroxicarbonilo. A quercetina possui todos os elementos estruturais característicos de um antioxidante: (1) um grupo orto-dihidroxilo ou um grupo catecol no anel B, (2) uma 2,3-dupla ligação e (3) grupos 3,5-OH com um grupo 4-oxo. A elevada potencialidade antiproliferativa da quercetina pode ser atribuída às substituições dos grupos hidroxilo, nomeadamente, às substituições que ocorrem no carbono 3 do anel B e no carbono 5 do anel A [51, 52].

1.5.3.2. Farmacocinética

Até ao momento, a farmacocinética da quercetina não se encontra ainda completamente caracterizada, embora já tenham sido realizados estudos em animais e humanos. Os flavonoides glicosilados provenientes da dieta atravessam o intestino delgado, são hidrolisados a agliconas por enterobactérias no cego e no cólon e, posteriormente, absorvidos pelas células epiteliais do cólon por difusão simples dependente de lipofilicidade. Também os glicosídeos de quercetina podem ser diretamente absorvidos através do transportador de glicose-1 dependente de sódio (SGLT-1) ou excretado para o lúmen intestinal através da proteína associada à resistência multifármacos-2 (MRP-2 do inglês *multidrug resistance-associated protein 2*). Depois de absorvidos, os glicosídeos de quercetina são muitas vezes hidrolisados por β -glucosidases intracelulares. A quercetina absorvida pelo lúmen intestinal é convertida,

maioritariamente, em metabolitos conjugados antes de entrar em circulação, sendo os principais presentes no plasma humano a quercetina 3'-O β -D-glucuronido (Q3'GA) e a quercetina 4'-O β -D-glucuronido (Q4'GA). Existem ainda outros metabolitos que possuem uma atividade considerável, onde se incluem a Q3GA, a Q3'GA e a Q4'GA [51, 52].

No que diz respeito à biodistribuição, um estudo recente [52] observou que a quercetina se concentrava nos pulmões, nos testículos, nos rins, no timo, no coração e no fígado, com elevadas concentrações desta, assim como dos seus derivados metilados, no tecido pulmonar. A eliminação urinária da quercetina não é uma das principais vias de excreção em humanos ou em ratos, pois uma parte substancial dos seus metabolitos pode ser excretada pela biliar. A quercetina pode sofrer degradação microbiana no cólon com formação de ácidos fenólicos e CO₂, que depois é exalado pela respiração [52, 53].

A baixa biodisponibilidade da quercetina e as elevadas concentrações de metabolitos são indicativos de um metabolismo de primeira passagem no intestino e/ou no fígado. Além disso, a elevada concentração de quercetina conjugada observada na biliar permite verificar a existência de recirculação entero-hepática [52, 53].

1.5.3.3. Propriedades Anticancerígenas

Estudos realizados em culturas celulares mostraram que a quercetina possui atividade anticancerígena relativamente a alguns tipos de células tumorais, o que poderá dever-se às suas propriedades antioxidantes ou anti-inflamatórias, e ainda a outros mecanismos de ação menos explorados [53]. Outros estudos recentes sugeriram que a quercetina pode retardar o crescimento destas células e pode ajudar a promover a apoptose, o que a transforma num composto que pode ajudar a proteger contra certos tipos de cancro [53, 54].

Tem sido demonstrado que a quercetina inibe enzimas envolvidas na proliferação celular e na via de transdução de sinal, onde se inclui a proteína cinase C, a tirosina cinase, a fosfatase cdc25, a PI-3 cinase, a proteína cinase B fosforilada (P-Akt), a DNA topoisomerase II e a cinase N-terminal c-Jun (JNK). A quercetina possui uma vasta gama de outras atividades biológicas, nomeadamente, a inibição da expressão da p53 mutada e da função e expressão do recetor de androgénios em células cancerígenas da próstata (LNCaP) [55].

Também foi alvo de estudo o bloqueio da atividade tirosina cinase do recetor do fator de crescimento epidérmico pela quercetina, que culmina com a inibição do crescimento e apoptose de determinadas células tumorais [56].

Por outro lado, tem-se verificado em diferentes tipos de células que o tratamento com quercetina provoca paragem do ciclo celular, ao nível da fase G2/M ou da fase G1 [47]. É sabido também que a survivina, um membro da família de inibidores de genes pró-apoptóticos, é expressa no ciclo celular de forma dependente, em resposta à quercetina, aumentando na fase G2/M do ciclo e diminuindo, de seguida, na fase G1. A expressão da survivina é regulada através do tratamento com quercetina, por ativação da cinase extracelular regulada (ERK) por deacetilação da histona H3, onde a quercetina ativou a enzima deacetilase histona que, por sua vez, reduziu a acetilação da histona H3 [55].

Além disso, a apoptose mediada pela quercetina pode resultar da indução de stress proteico, da rutura de microtúbulos e mitocôndrias, da libertação do citocromo c e ativação de caspases [47]. Um outro estudo revelou que a quercetina permitiu o aumento da caspase-9 ativa e a expressão de Bax, simultaneamente com uma diminuição concomitante dos níveis de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, sugerindo que este composto induz a apoptose através da via mitocondrial [57]. Sabe-se também que o ligando indutor de apoptose do fator de necrose tumoral (TRAIL), um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), desencadeia o processo apoptótico numa variedade de células malignas sem provocar toxicidade nas células normais. Foi igualmente verificado que a quercetina pode promover a morte induzida por apoptose através do TRAIL [55].

Recentemente, surgiram resultados que demonstram os efeitos reversíveis da quercetina sobre a resistência multifármacos (MDR), tornando-a um agente promissor também nesse sentido. A resistência multifármacos pode diminuir ou mesmo anular a eficácia de fármacos citostáticos no tratamento do cancro e um dos mecanismos envolvidos neste tipo de resistência celular consiste no aumento da expressão das proteínas de efluxo, tais como a glicoproteína-p (P-gp) e os membros da família de proteínas relacionadas com a resistência a multifármacos (MRP do inglês *multidrug resistance-associated protein*), ambas pertencentes à superfamília de transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*). Estas bombas de efluxo bombeiam o agente de quimioterapia para o exterior das células comprometendo a sua ação intracelular. A MRP1 (ABCC1) possui uma vasta especificidade de substratos, entre os quais os S-

conjugados de glutathione, conjugados glucuronidos, conjugados de sulfato, fármacos anticancerígenos e aniões orgânicos. A MRP2, o principal transportador aniônico orgânico canalicular multiespecífico, encontra-se intimamente relacionada com a MRP1 possuindo, de igual modo, uma ampla especificidade de substrato. Neste sentido, uma estratégia para ultrapassar a resistência multifármacos mediada por este tipo de transportadores baseia-se na identificação de compostos que possam atuar como inibidores destes transportadores [58].

Certos estudos verificaram que a quercetina interage com a P-gp, inibindo a sua atividade ou diminuindo a sua expressão. Por outro lado, observou-se que esta interação com a P-gp se efetuava ao nível do local de ligação a ATP ou do local de ligação de substrato [52]. Outros estudos mostraram que existe uma interação entre a MRP1 e a quercetina, na medida em que esta última tem a capacidade de reduzir a concentração intracelular de glutathione que é necessária para o efluxo pela MRP1 [58]. A quercetina atua então como substrato da MRP1 através da inibição competitiva com outros substratos, o que impede o efluxo através desta proteína de efluxo por ligação direta ou indireta aos locais de ligação de ATP. Associadamente, modula a expressão da MRP1 [52, 58].

Como já foi referido, outros estudos demonstraram que a expressão do transportador de glicose 1 está aumentada em alguns tipos de tumores, tais como o carcinoma hepatocelular, promovendo a tumorigénese presente em células tumorais. Além disso, outros estudos demonstraram que os flavonoides e as isoflavonas são potentes inibidores de influxo da glicose, tendo sido demonstrado que os flavonóis (como a quercetina) inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP, sendo também capazes de inibir, competitivamente, o GLUT-1 através deste mecanismo. Assim, também através deste mecanismo, a quercetina pode ser considerada um potencial agente antitumoral [38, 59-61].

Estudos recentes mostraram ainda que existe uma relação entre a expressão da proteína p53 e a resposta de células e modelos animais tumorais à quercetina. Wang *et al* demonstraram que a quercetina pode potenciar o efeito da doxorubicina através do aumento da expressão de p53 em linhas celulares de CHC, resultados estes confirmados ainda por um modelo animal de xenotransplante heterotópico. Algo semelhante foi observado por Chan *et al*, mas desta vez em linhas celulares e modelos animais de cancro do pulmão, onde a quercetina potenciou o efeito de tricostatina A de um modo dependente da p53. Estes resultados abrem portas para a possibilidade da utilização da

quercetina em combinação com os fármacos utilizados tradicionalmente em quimioterapia [61-63].

Deste modo, a quercetina pode ser considerada um potencial agente terapêutico em células de tumores primários de fígado, na medida em que se poderá verificar o seu efeito anticancerígeno como possível inibidor do GLUT-1, entre outras características.

1.6. OBJETIVOS

Os tumores primários do fígado são um problema de importância global, sendo que a sua incidência é crescente e as opções terapêuticas limitadas, urgindo a necessidade de busca de novos alvos terapêuticos, assim como novas moléculas com potencial curativo para este tipo de tumores.

O carcinoma hepatocelular é o tumor primário de fígado mais comum, estando a expressão do GLUT-1 aumentada neste tipo de tumor, promovendo a tumorigênese. Também no colangiocarcinoma tem sido sugerido um aumento da expressão daquele transportador, embora o seu efeito na tumorigênese deste tipo de tumor não esteja ainda bem estudado [64-67]. Os flavonoides, em especial a quercetina, são inibidores competitivos do GLUT-1 e podem constituir armas terapêuticas bastante úteis no tratamento desta patologia. Assim, o principal objetivo deste trabalho experimental consiste na avaliação do efeito anticancerígeno da quercetina em várias linhas celulares de CHC que diferem entre si na expressão do gene supressor tumoral TP53 e numa linha celular de CC. Deste modo, as metas deste trabalho são:

1. Avaliar o efeito da quercetina na proliferação celular recorrendo ao teste do MTT (Cálculo da concentração inibitória média IC_{50}), e na sobrevivência celular através de ensaios clonogénicos;
2. Avaliar o efeito do sorafenib na proliferação celular, recorrendo ao teste do MTT;
3. Avaliar o efeito da ação combinada da quercetina com o sorafenib ao nível da proliferação celular através do teste do MTT;
4. Analisar o tipo de morte celular induzida pela quercetina (recorrendo à dupla marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídeo) por citometria de fluxo;

5. Estudar o efeito da quercetina na expressão proteica de Bax e Bcl-2;
6. Estudar alterações induzidas pela quercetina no ciclo celular;
7. Estudar o efeito da quercetina na expressão proteica de GLUT-1;
8. Estudar alterações induzidas pela quercetina ao nível da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio e defesas antioxidantes;
9. Avaliar o efeito da quercetina no influxo de ^{18}F -FDG, através de estudos de captação com ^{18}F -FDG;
10. Determinar o efeito da quercetina na expressão e ativação da proteína p53 por *western blot*.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

O efeito antitumoral dos flavonoides tem sido estudado, com o intuito de induzir a apoptose e a inibir o crescimento celular numa ampla variedade de linhas celulares tumorais. Por outro lado, sabe-se que os flavonoides são potentes inibidores do influxo de glicose, tendo-se demonstrado que os flavonóis, onde se inclui a quercetina, inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP, sendo capazes também de inibir o GLUT-1 através deste mecanismo.

Assim, com o objetivo de avaliar o efeito anticancerígeno da quercetina em tumores primários do fígado, foram realizados estudos *in vitro*, que permitiram analisar e caracterizar a ação da quercetina a nível celular, de forma a ser-nos possível conhecer e/ou caracterizar o seu potencial citotóxico.

Para realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas culturas celulares e todas as metodologias adequadas a esta técnica.

2.1. CULTURAS CELULARES

As culturas celulares permitem o cultivo, crescimento e propagação de células dispersas, associado a uma manutenção que requer rigorosas e controladas condições de assepsia e esterilidade.

Para todas as experiências, foram utilizadas quatro linhas celulares humanas de tumores primários do fígado, três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, designadas por HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7 e uma linha celular de colangiocarcinoma, designada TFK-1. A linha celular HepG2 expressa a forma normal da p53, a HuH7 expressa uma forma mutada da p53 e a Hep3B2.1-7 não sobreexpressa p53 [68, 69]. Após receção, estas linhas foram descongeladas e propagadas em cultura aderente de acordo com as indicações do seu fornecedor, a *American Type Culture Collection* (ATCC), no caso das linhas HepG2 e Hep3B2.1-7, a *Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB), para a linha celular HuH7, e a *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ), no caso da linha TFK-1. As linhas celulares foram mantidas a 37°C, em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, em incubadora *Binder*.

As linhas celulares HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7 foram propagadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648), enquanto que

para a linha celular TFK-1 se utilizou o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130). Ambos foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS do inglês *fetal bovine serum*; Sigma, F7524), 1% de antibiótico (Gibco, 15240) e piruvato de sódio (Gibco, 11360) numa concentração de 100 mM para o DMEM e de 400 mM no caso do RPMI. O pH dos meios de cultura utilizados foi acertado para 7,4.

Para a realização de estudos *in vitro*, e tendo em conta que todas as linhas celulares utilizadas são mantidas em cultura aderente, foi necessário destacar as mesmas dos frascos e preparar suspensões celulares. Inicialmente, procedeu-se à lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS do inglês *phosphate buffer saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662) (pH=7,4)), incubando-se, de seguida, com 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco, 25200) durante cerca de 3 minutos a 37°C. Posteriormente, adicionaram-se pelo menos 4 mL de meio de cultura de forma a inativar a tripsina. Para a determinação do número de células, diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e fez-se a contagem num microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100) com ampliação de 100 vezes, utilizando para tal uma câmara de *neubauer*. Adicionou-se, em seguida, meio de cultura à suspensão celular com o intuito de obter a concentração celular pretendida para cada estudo.

Para os estudos de captação de ¹⁸F-FDG, as células foram cultivadas quer em meio com elevado teor de glicose (25 mM), por nós denominado *high glucose* (HG), quer em meio com baixo teor de glicose (5 mM), por nós denominado *low glucose* (LG). Para todos os outros ensaios, as células foram apenas cultivadas em meio HG.

2.2. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Para avaliação da ação citotóxica da quercetina (Sigma, F2003) e do sorafenib¹ as culturas celulares foram incubadas com diversas concentrações destes compostos que variaram entre 1 µM e 250 µM para a quercetina e entre 0,25 µM e 100 µM para o

¹ Gentilmente cedido pela Bayer, 1024-03D

sorafenib. Ambos os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma, D4540). A proliferação celular foi avaliada 24, 48, 72 e 96 horas após o procedimento pelo teste colorimétrico denominado por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), abaixo descrito.

2.2.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DO MTT

Para avaliar o efeito da quercetina na proliferação celular foi realizado o ensaio do MTT. As células metabolicamente ativas internalizam o MTT por endocitose [70]. Este ensaio é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases, presentes nas células viáveis, clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais de formazano de cor azul escura, sendo que esta reação ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase succinato-coenzima Q redutase. Posteriormente, os cristais formados podem ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Quando as membranas celulares estão íntegras, o MTT atravessa-as, o que induz a formação e acumulação de cristais de formazano nas células viáveis. Conseqüentemente, como o número de células vivas é proporcional à quantidade de cristais de formazano produzidos, o ensaio do MTT é um método indireto na determinação da proliferação celular a partir da atividade mitocondrial [71].

Para este estudo foi necessária uma suspensão celular com 5×10^4 células/mL em meio de cultura, a qual foi distribuída por placas de 24 poços, contendo cada poço 500 μ L da suspensão. Após 24 horas, as células foram incubadas com as diferentes concentrações de quercetina acima mencionadas e reservaram-se poços controle, aos quais nada foi adicionado, e poços solvente aos quais foi adicionada apenas o solvente da quercetina, neste caso o DMSO. De igual forma se procedeu com o sorafenib. Ultrapassados os referidos tempos de incubação, a proliferação celular foi avaliada recorrendo ao mencionado teste do MTT. Para tal, o meio das culturas celulares foi retirado, de seguida adicionaram-se 500 μ L de PBS a cada poço para lavagem e, posteriormente, 150 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/ μ L; Sigma, M2128) em PBS, pH=7,4, e incubaram-se as placas no escuro a 37°C. Passadas 3 horas, acrescentaram-se a cada poço 150 μ L de uma solução de isopropanol (Sigma, 278475), com 0,04 M de ácido clorídrico 37% fumante (Sigma, 258148), e as placas de cultura foram colocadas numa placa de agitação durante 30 minutos, com o objetivo de solubilizar os cristais de

formazano formados. O conteúdo de cada poço foi, posteriormente, transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância medida a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando um espectrofotômetro ELISA (Biotek® *Synergy HT*). A citotoxicidade foi expressa como a porcentagem de proliferação nas culturas submetidas ao tratamento em relação à proliferação das culturas incubadas com o solvente.

Este procedimento permitiu estabelecer curvas de dose-resposta e determinar a concentração inibitória média (IC₅₀), ou seja, a concentração dos fármacos utilizados que inibe a proliferação das culturas celulares em 50%. Os resultados obtidos foram analisados e processados no programa OriginPro 8.0.

2.2.1.1. Avaliação do Efeito da Combinação da Quercetina com o Sorafenib

Para verificar o tipo de resposta produzida pela combinação da quercetina com o sorafenib, foi utilizado o método de Chou e Talalay para quantificação de sinergia, adição ou antagonismo [72]. Este método avalia o tipo de resposta produzida ao nível da proliferação celular com a utilização dos valores de IC₅₀ obtidos para cada uma das terapias isoladamente e para a sua combinação, através da seguinte equação:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

Equação 2.1.: Cálculo do índice de combinação.

em que CI representa o índice de combinação, (D)₁ representa o valor do IC₅₀ obtido para o efeito isolado do fármaco 1, (D)₂ representa o IC₅₀ obtido para o tratamento com o fármaco 2, e (D_x)₁ e (D_x)₂ representam o valor obtido em combinação. Para valores de CI inferiores a 1, é obtida sinergia, para valores iguais a 1, verifica-se efeito de adição e para valores superiores a 1, verifica-se antagonismo.

Para esta avaliação foi utilizado ¼ do valor do IC₅₀ obtido para a incubação das culturas celulares com a quercetina, após 48 horas de exposição, com a sua combinação com diferentes concentrações de sorafenib, nomeadamente de 0,25 µM a 100 µM. A adição do sorafenib efetuou-se em três etapas diferentes, no momento, 2 horas e 24 horas após a incubação com a quercetina, de modo a determinar qual a melhor estratégia de utilização destas terapias em combinação, ou seja, de modo a verificar se os

resultados obtidos são mais promissores quando os fármacos são adicionados em simultâneo ou com desfasamento. Para todas as condições referidas, foi verificada a resposta produzida pela avaliação com o teste do MTT 48 horas após a adição de quercetina.

2.3. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR POR ENSAIO CLONOGÉNICO

O ensaio clonogénico é uma técnica que tem por objetivo a determinação da sobrevivência celular tendo por base a capacidade de uma única célula crescer e formar uma colónia, após submissão a um tratamento. Para este estudo foram semeadas 500 células por poço, numa placa de seis poços e colocados 3 mL de meio de cultura em cada poço. As condições estudadas neste ensaio estão enumeradas e descritas na tabela 2.1. e foram escolhidas de acordo com os valores de IC_{50} obtidos após 48 horas de incubação com quercetina.

Tabela 2.1.: Condições utilizadas em cada poço para o ensaio clonogénico.

Linha celular	Condição	Concentração de quercetina
HepG2	1	Controlo
	2	5 μ M
	3	37,67 μ M
	4	100 μ M
HuH7	5	Controlo
	6	5 μ M
	7	90,60 μ M
	8	200 μ M
Hep3B2.1-7	9	Controlo
	10	5 μ M
	11	50,35 μ M
	12	100 μ M
TFK-1	13	Controlo
	14	5 μ M
	15	48,65 μ M
	16	100 μ M

Assim, 24 horas após as células serem semeadas, procedeu-se à incubação com diferentes concentrações de quercetina, sendo que o controlo realizado corresponde às condições número 1, 5, 9 e 13, com culturas não tratadas. Doze dias após o tratamento, foi feita a visualização e contagem das colónias, e para isso o meio foi aspirado e as células foram lavadas com 2 mL de PBS. Seguidamente, foram adicionados 2 mL de metanol a cada poço durante 5 minutos para fixar as colónias, procedimento que foi repetido duas vezes. Foi dado às placas tempo suficiente para a sua secagem, e em seguida adicionaram-se 2 mL do corante violeta de cristal (Sigma, M12128) (0,5% diluído em metanol). Após os 5 minutos necessários à ação do corante, este foi aspirado e as placas foram lavadas em água tépida e deixadas a secar. O número de colónias foi posteriormente contado, o que permitiu o cálculo da *plate efficiency* e do fator de sobrevivência pelas seguintes equações:

$$Plate\ efficiency = \frac{\text{número de colónias contadas}}{\text{número de colónias semeadas}} \times 100$$

Equação 2.2.: Cálculo da *plate efficiency*.

$$\text{Factor de sobrevivência} = \frac{Plate\ efficiency\ das\ amostras\ tratadas}{Plate\ efficiency\ das\ amostras\ controlo} \times 100$$

Equação 2.3.: Cálculo do fator de sobrevivência.

2.4. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Assim, é possível analisar simultaneamente múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão através de um aparelho de deteção opto-eletrónico. No citómetro, representado na figura 2.1., um feixe de luz de um único comprimento de onda é direcionado para um meio líquido em fluxo. Vários detetores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz: um na linha do feixe de luz (*forward scatter*, FSC) e vários perpendiculares a este (*side scatter*, SSC), além de um ou mais

detetores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detetores e, por análise das flutuações de brilho de cada detetor (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. A FSC correlaciona-se com o volume celular e a SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana) [73].

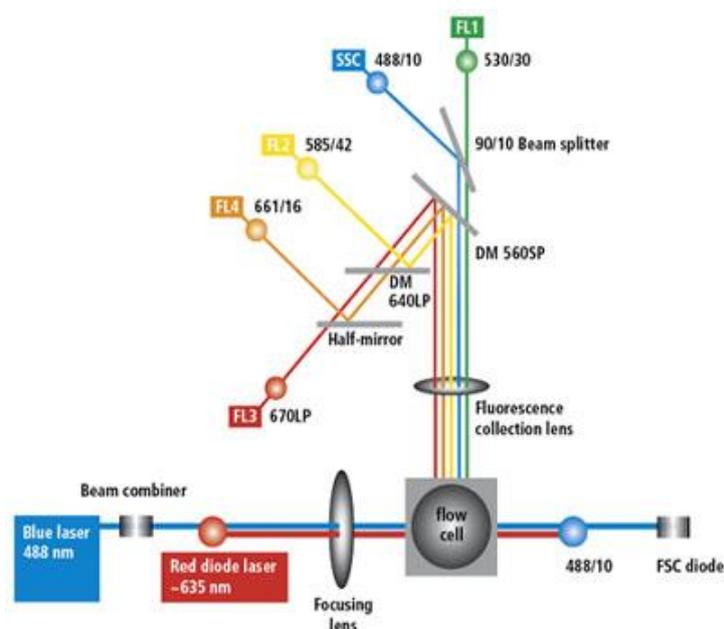


Figura 2.1.: Representação esquemática do sistema óptico de um citómetro de fluxo. Retirado de <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facsalibur/features/>, acessado a 14 de abril de 2013 às 18h45m.

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada com o intuito de avaliar os efeitos da quercetina em monoterapia ao nível da morte celular, da expressão proteica de Bax e Bcl-2, de alterações induzidas no ciclo celular, da expressão proteica de GLUT-1, dos níveis de espécies reativas de oxigénio, assim como das defesas antioxidantes.

Para este estudo, o tratamento aplicado às culturas celulares foi semelhante ao procedimento descrito para o ensaio clonogénico, de forma a serem obtidas as condições representadas na tabela 2.1.. A avaliação foi realizada 48 horas após a incubação das culturas celulares com a quercetina.

Para todas as marcações foram necessárias aproximadamente 10^6 células. O número de eventos obtidos através do programa CellQuestTM, correspondente ao número de células, foi de 10^4 . Para análise e quantificação da informação utilizou-se um *software* específico que corre em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

2.4.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E TIPOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA

Para determinar e caracterizar os tipos de morte celular induzida pela quercetina foi utilizada a técnica de citometria de fluxo através da dupla marcação com a anexina V (AV) ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o iodeto de propídeo (IP). Esta técnica permite distinguir as células viáveis das células mortas e dentro destas distinguir qual o mecanismo que desencadeou a morte celular (apoptose ou necrose). Uma das características das células em apoptose é a alteração da distribuição dos fosfolípidos da bicamada lipídica que constitui a membrana celular. Assim, quando se inicia a morte celular por apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. A AV é uma molécula com elevada afinidade por fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina, à qual se liga. Quando conjugada com o fluorocromo FITC, a AV permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana celular e identificar as células em apoptose inicial. Por outro lado, as células em necrose perdem a integridade da membrana celular, permitindo a entrada do IP para o interior da célula. O IP é um composto que se intercala na dupla cadeia de ADN emitindo fluorescência. No entanto, a perda de integridade membranar, ou seja, a rutura da membrana celular ocorre também nas fases mais avançadas da apoptose permitindo a entrada de IP. Deste modo, as células vivas apresentam-se negativas tanto para a marcação com AV-FITC como para a marcação com IP, enquanto as células em apoptose inicial apresentam-se positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para a marcação com o IP. Por outro lado, as células que se apresentam positivas para as duas marcações significa que se encontram em apoptose tardia/necrose e as células que se encontram em necrose apresentam-se negativas para a marcação com

AV-FITC e positivas para a marcação com o IP [74]. Os padrões de marcação com anexina V e iodeto de propídeo estão esquematizados na tabela 2.2..

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

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

Para esta dupla marcação, após a tripsinização, as células foram centrifugadas a 1300 G, durante 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. O *pellet* foi ressuspensão em PBS e submetido novamente a centrifugação. O *pellet* obtido foi processado de acordo com as instruções do *kit* de detecção de morte celular da Immunostep, sendo colocado em gelo e ressuspensão em 100 µL de tampão de ligação frio (constituído por 0,1 M de HEPES (Sigma, H7523), 1,4 M de NaCl (Sigma, S7653) e 25 mM de CaCl₂ (Sigma, C4901)), sendo-lhe adicionados 2,5 µL de AV-FITC (kit Immunostep) e 1 µL de IP (kit Immunostep) durante 15 minutos na ausência de luz. Após o tempo de incubação adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação às suspensões celulares, sendo depois guardadas a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. Posteriormente, foi feita a detecção por citometria de fluxo utilizando um citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argon e os comprimentos de onda de excitação de 525 e 640 nm para a AV-FITC e para o IP, respetivamente. Os resultados foram expressos em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e basearam-se na positividade e/ou negatividade de marcação para a AV-FITC/IP.

2.4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BAX E BCL-2

A apoptose é um processo essencial para a manutenção e desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a

apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características deste tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do ADN e formação de corpos apoptóticos [75].

Muitas são as moléculas envolvidas no controlo das vias de ativação da apoptose, tais como, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente na regulação da apoptose [75]. Os membros da família Bcl-2, como a Bcl-2 e a Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a libertação de citocromo-c e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, a Bax, a Bid e a Bak são proteínas pró-apoptóticas [76]. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigénio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria [77]. A homeostasia é mantida pelo balanço entre a quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como danos no ADN, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas e diminuição da expressão das proteínas antiapoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose. Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (antiapoptótica). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl2) e heterodímeros (Bax-Bcl2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o estímulo pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula [78]. Após um estímulo de morte, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo silenciamento de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial. Por sua vez, a Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas [79].

De forma a avaliar da expressão proteica de Bcl-2 e de Bax, após a tripsinização, as suspensões celulares foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 G e, posteriormente, ressuspensas em 1 mL de PBS, procedendo-se de seguida a nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de solução A (Solução fixante – (Immunostep, *Intracell Kit*)) e as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 2 mL de PBS, centrifugou-se novamente a suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL de solução B (Solução permeabilizante – (Immunostep, *Intracell*

Kit)) e 3 μL de anti-Bax-PE (SantaCruz, sc-20067PE) e 3 μL de anti-Bcl2-FITC (SantaCruz, sc-509FITC). Agitou-se suavemente a suspensão celular e as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se novamente 2 mL de PBS, centrifugou-se a suspensão celular a 1300 G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Por fim, ressuspenderam-se as células em 400 μL de PBS e estas foram guardadas a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. A detecção foi feita utilizando os comprimentos de onda de excitação de 585 nm para a Bax e de 530 nm para a Bcl-2. Os resultados obtidos são expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF), tendo-se calculado posteriormente a razão Bax/Bcl-2.

2.4.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

A morte celular e/ou a inibição da proliferação celular é, muitas vezes, acompanhada por paragens no ciclo celular. De forma a determinar a fase do ciclo celular em que ocorre paragem do crescimento celular, foi utilizado iodeto de propídeo (IP), corante mais comumente utilizado para análise de ADN e ciclo celular por citometria de fluxo.

Uma vez que este corante tem a capacidade de se ligar ao ADN intercalando-se na dupla cadeia da macromolécula, a quantidade de corante ligado é proporcional à quantidade de ADN. Assim, é possível a quantificação do conteúdo de ADN, o que nos permite conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular. As células podem ser classificadas como células em fase G2 e M, G0, G1 e S. Conseguem-se ainda detetar um pico pré-G1, pico pré-apoptótico [80].

A avaliação foi feita através da utilização de *PI/RNase solution*. Para este ensaio, após tripsinização, as células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 μL de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex e incubaram-se os tubos durante 30 minutos a 4°C no escuro. Lavaram-se as células com 2 mL de PBS e centrifugaram-se a 1300 G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 μL de *IP/RNase solution* (Immunostep, *PI/RNase solution*) e incubaram-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, as suspensões celulares foram guardadas a 4°C

até aquisição no citômetro de fluxo. A detecção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

2.4.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE GLUT-1

O GLUT-1 é um transportador de glicose que, tal como referido anteriormente, se localiza preferencialmente na membrana celular, onde realiza as suas funções como transportador trans-membranar. No entanto, este também se pode encontrar no citoplasma, podendo ser translocado para a membrana em resposta a alguns estímulos, daí a importância de determinar as duas frações.

2.4.4.1. Avaliação da Expressão Membranar de GLUT-1

Para avaliar a expressão membranar de GLUT-1, após tripsinização, a suspensão celular foi centrifugada a 1300 G durante 5 minutos, sendo de seguida decantado o sobrenadante. Posteriormente, as células foram ressuspensas em PBS e centrifugadas durante 5 minutos a 1300 G. Seguidamente, decantou-se o sobrenadante e as células foram marcadas com 3 µL de anticorpo monoclonal anti-hGLUT1-PE (PE, ficoeritrina) (R&D Systems, MAB1349) durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS por centrifugação a 1300 G durante 5 minutos e, posteriormente, ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão. As suspensões celulares foram guardadas a 4°C até aquisição no citômetro de fluxo. As células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur) utilizando o comprimento de onda de excitação de 585 nm e os resultados obtidos expressos em termos de MIF.

2.4.4.2. Avaliação da Expressão Citoplasmática de GLUT-1

Para avaliar a expressão citoplasmática de GLUT-1, após a tripsinização, a suspensão celular foi centrifugada a 1300 G durante 5 minutos, sendo de seguida decantado o sobrenadante. Posteriormente, as células foram ressuspensas em PBS e centrifugadas durante 5 minutos a 1300 G. De seguida, decantou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 µL de Solução A (Solução fixante – (Immunostep, *Intracell Kit*)) e

as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS por centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. De seguida, decantou-se o sobrenadante, adicionaram-se 100 µL de Solução B (Solução permeabilizante – (Immunostep, *Intracell Kit*)) e 3 µL de anticorpo monoclonal anti-hGLUT1-PE (R&D Systems, MAB1349) e incubou-se, novamente, durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1300 G, durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão. Estas células foram guardadas a 4°C até aquisição no citómetro de fluxo. Posteriormente, as células foram analisadas no citómetro (FACSCalibur) utilizando o comprimento de onda de excitação de 585 nm e os resultados obtidos foram expressos como MIF.

2.4.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO

As espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigénio molecular (O₂) ou derivados dos produtos da sua redução.

A formação de ROS pode resultar de uma resposta a uma agressão celular ou a um tratamento com um determinado composto. Entre elas encontram-se os peróxidos e o radical superóxido. Para além das ROS e/ou como resposta à produção das mesmas, acontece também a produção de defesas antioxidantes, tais como o glutatião reduzido (GSH). O balanço existente entre as ROS e as defesas antioxidantes é importante, uma vez que permite manter a homeostase. Está referido na literatura que a quercetina é um composto pró-oxidante, daí a importância de avaliar as ROS, bem como as defesas antioxidantes.

2.4.5.1. Avaliação da Produção Intracelular de Peróxidos

O composto DCFH₂-DA é uma sonda não fluorescente lipossolúvel, com capacidade de atravessar a membrana celular. Uma vez no espaço intracelular, é acumulado no citosol onde é desacetilado por esterases sob a forma de 2'-7'-

diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto não fluorescente é oxidado na presença de peróxidos com formação de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522 nm quando excitada a 498 nm. A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, nomeadamente do peróxido de hidrogénio [81].

Para este estudo, após a tripsinização, a suspensão celular foi centrifugada a 1300 G durante 5 minutos, e uma vez retirado o sobrenadante, fez-se uma lavagem com PBS através de uma centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de PBS e foi incubado durante 45 minutos no escuro a 37°C com 3 µL de DCFH₂-DA a 1 mM (Sigma, 35848) dissolvido em DMSO, de modo a obter uma concentração final de 3 µM. Posteriormente, a suspensão foi lavada mais uma vez com PBS, centrifugada a 1300 G durante 5 minutos, e ressuspenso em 400 µL do mesmo, sendo depois guardada a 4°C. A deteção foi feita no citómetro de fluxo com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 504 a 529 nm, respetivamente. Os resultados obtidos foram analisados em termos de MIF.

2.4.5.2. Avaliação da Produção Intracelular de Radical Superóxido

A avaliação da produção de radical superóxido foi efetuada por citometria de fluxo com recurso ao DHE (sonda dihidroetidina). Este composto atravessa facilmente as membranas celulares para o espaço intracelular onde ocorre a sua conversão a etídeo pelo radical superóxido. O etídeo é um composto fluorescente de cor vermelha que tem a capacidade de se intercalar no ADN permanecendo no interior da célula. Esta reação é relativamente específica para o radical superóxido, com oxidação mínima pelo peróxido de hidrogénio, peróxido de nitrito ou ácido hipocloroso [81].

Para este procedimento, após tripsinização, as células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos e o *pellet* obtido foi lavado com PBS por centrifugação a 1300 G durante 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS e foram adicionados 5 µL de DHE a 1 mM (Sigma, D7008) dissolvido em DMSO, de modo a obter uma concentração final de 5 µM. Após 15 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, a suspensão foi lavada com PBS, centrifugada a 1300 G durante 5 minutos e novamente ressuspenso em 400 µL do mesmo. A deteção foi feita no citómetro de fluxo utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm.

2.4.5.3. Avaliação da Expressão Intracelular de Glutatião Reduzido

De forma a avaliar a expressão intracelular de glutatião reduzido (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, foi utilizada a citometria de fluxo com recurso a um composto fluorescente, o alaranjado de mercúrio. Este composto reage rapidamente com o GSH, dando origem a um produto de reação que emite uma intensa fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon no comprimento de onda de 488 nm [82].

Para este procedimento, após a tripsinização, as células foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de PBS e foi adicionado 4 µL de alaranjado de mercúrio (Sigma, M7750) a uma concentração de 10 mM diluído em acetona (Sigma, 34850). Homogeneizou-se a suspensão e incubou-se durante 15 minutos no escuro a 37°C. Após a incubação, a suspensão foi lavada com 2 mL de PBS, centrifugada a 1300 G durante 5 minutos, e ressuspensa em 400 µL do mesmo, sendo posteriormente guardada a 4°C. A deteção foi feita no citómetro de fluxo no comprimento de onda de 620 nm e os resultados obtidos foram expressos como MIF.

2.5. ESTUDOS DE CAPTAÇÃO DE ¹⁸F-FDG

Os transportadores de glucose desempenham um papel fundamental no perfil cinético de muitos fármacos. Presentes em todas as barreiras farmacológicas, estas proteínas determinam a absorção e distribuição de vários fármacos [38].

Desta forma, e sendo o ¹⁸F-FDG um análogo radiomarcado da glicose que é transportado preferencialmente pelos GLUT's 1 e 3 [42], é possível estudar a captação deste radiofármaco para avaliar o perfil de captação do mesmo ao longo do tempo e, por analogia, o perfil de captação de glicose, pelas linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 e pelas mesmas linhas incubadas, previamente, durante 1 hora com quercetina que, como foi dito anteriormente, está descrita em alguns trabalhos como sendo um inibidor competitivo do GLUT-1 [46].

Para a realização dos estudos de captação foi necessário preparar uma suspensão celular com 2×10^6 células/mL. As células, como referido anteriormente, foram cultivadas quer em meio denominado *high glucose*, quer em meio *low glucose*. No caso da linha celular TFK-1, e uma vez que esta linha celular não prolifera quando cultivada em meio *low glucose*, foi cultivada sempre em meio *high glucose*, sendo que para a realização de estudos em *low glucose*, o meio de cultura em baixo teor de glicose foi adicionado às culturas celulares somente 24 horas antes dos estudos de captação. Após a preparação das suspensões celulares, as células foram colocadas a repousar em frascos de cultura de 25 cm², a 37°C durante 60 minutos para recuperarem do stresse induzido pela ação da tripsina. Depois do tempo de repouso, adicionou-se à suspensão celular o radiofármaco em estudo (¹⁸F-FDG) numa atividade igual a 25 µCi/mL. Após 5, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação com o radiofármaco, foram retiradas amostras de 200 µL da suspensão celular para tubos de *ependorf* que continham solução de PBS gelado, de modo a reduzir o metabolismo celular. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 5600 G durante 60 segundos para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, sendo este recolhido para um tubo devidamente identificado. Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com 500 µL de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante por centrifugação para obter a completa rentabilização do sobrenadante. Os sobrenadantes resultantes das centrifugações foram recolhidos para os tubos identificados e os *pellets* permaneceram nos respetivos tubos de *ependorf* igualmente identificados. Cada um dos estudos foi realizado em duplicado.

Assim, pela contagem da radioatividade de ambas as frações (*pellet* e sobrenadante) no contador de poço (Capintec, Inc. CRC – 15W) traduzido em contagens por minuto (CPM), foi possível quantificar a percentagem de captação do ¹⁸F-FDG pelas células, segundo a equação seguinte, e traçar uma curva de captação ao longo do tempo.

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

Equação 2.4.: Cálculo da percentagem de captação.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM[®] SPSS[®] v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição normal e testes não paramétricos no caso contrário.

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

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

onde x_0 corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% (IC₅₀). A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas, dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica foi realizada segundo o teste ANOVA de um factor, com comparações múltiplas de acordo com a correcção de Bonferroni.

Na avaliação de tipo de morte celular, ciclo celular e razão Bax/Bcl-2 a comparação entre diferentes condições terapêuticas para cada linha celular foi efectuada realizando o teste ANOVA de um factor, no caso de existir normalidade da distribuição e homogeneidade das variâncias, ou o teste de Kruskal-Wallis em caso contrário. As comparações múltiplas seguiram a correcção de Bonferroni.

Na comparação entre condições terapêuticas da produção de ROS, capacidade clonogénica e expressão do GLUT-1, a comparação com o controlo foi realizada segundo o teste t de Student para uma média, enquanto que nas comparações entre as restantes condições foi utilizado o teste ANOVA de um factor ou o teste de Kruskal-Wallis (selecção do teste segundo os critérios anteriores). As comparações múltiplas foram obtidas segundo a correcção de Bonferroni. Na comparação da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1 para cada linha celular foi utilizado o teste t de Student para amostras emparelhadas ou o correspondente teste não paramétrico de Wilcoxon.

Na análise da captação de ^{18}F -FDG os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo exponencial utilizando o *software* OriginLab v. 8.0:

$$\text{Captação (\%)} = A \cdot (1 - e^{\ln(2) \cdot t / T_{50\%}})$$

onde A representa a captação máxima obtida (*steady state*) e $T_{50\%}$ o tempo que demora a ser atingida metade da captação máxima. Os parâmetros obtidos foram comparados com recurso ao teste ANOVA de um factor, com comparações múltiplas segundo a correcção de Bonferroni.

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

CAPÍTULO 3

RESULTADOS²

² Os resultados apresentados ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com a Mestre Ana Filipa Marques de Brito.

Este trabalho centra-se essencialmente no estudo dos mecanismos anticancerígenos da quercetina em tumores primários de fígado. Assim, foram utilizadas as metodologias descritas anteriormente de forma a verificar se a quercetina pode representar uma nova opção terapêutica nestes tipos de tumores.

3.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DO MTT

O ensaio do MTT permitiu obter valores de proliferação celular, em percentagem relativa a culturas celulares incubadas com o veículo às quais foi atribuído um valor de proliferação de 100%. Estes valores permitiram traçar as curvas dose-resposta, apresentadas ao longo da secção 3.1..

3.1.1. QUERCETINA

Para determinar o efeito citotóxico da quercetina nas linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, as culturas celulares foram incubadas com concentrações crescentes deste composto que variaram entre 1 μ M e 250 μ M. Os gráficos da figura 3.1. representam as curvas dose-resposta obtidas com o tratamento com quercetina nas linhas celulares HepG2 (figura 3.1. A), HuH7 (figura 3.1. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.1. C) e TFK-1 (figura 3.1. D) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

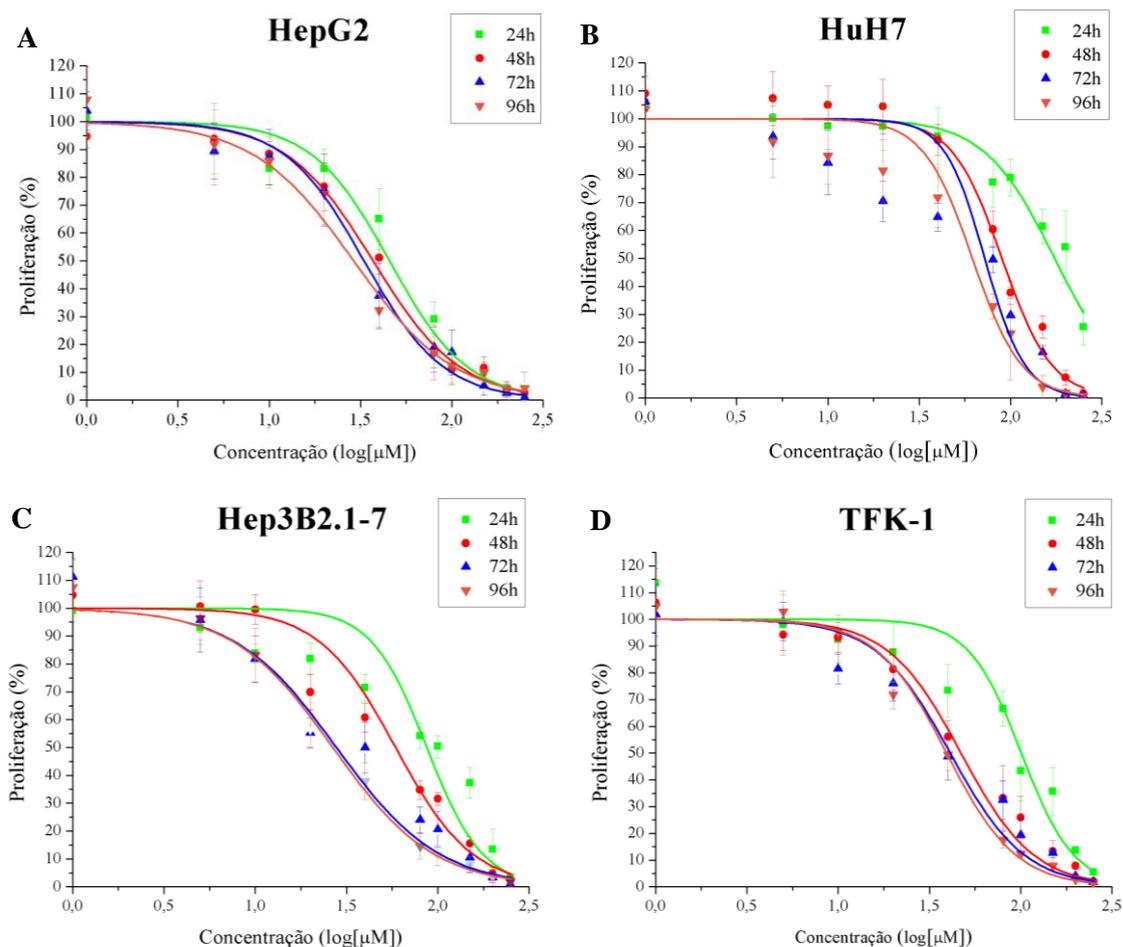


Figura 3.1.: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com quercetina. Avaliação da proliferação pelo ensaio do MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de quercetina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes.

A partir das curvas dose-resposta apresentadas foi possível calcular a concentração inibitória média (IC_{50}), ou seja, a concentração de quercetina necessária para inibir 50% da proliferação celular, nas diversas linhas celulares. Estes valores estão mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1.: Valores de IC_{50} , r^2 e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com quercetina para diferentes tempos de incubação.

Linha celular	Tempos de incubação	IC_{50} (μ M)	r^2	Intervalo de confiança (μ M)
HepG2	24h	45,53	0,98	[36,62; 56,61]
	48h	37,67	0,98	[31,24; 39,34]
	72h	33,06	0,99	[26,32; 35,91]
	96h	29,02	0,99	[24,38; 30,91]
HuH7	24h	174,26	0,95	[156,85; 193,61]
	48h	90,60	0,98	[79,35; 93,81]
	72h	72,21	0,95	[52,08; 81,29]
	96h	61,81	0,97	[53,36; 65,20]
Hep3B2.1-7	24h	87,07	0,93	[65,67; 115,44]
	48h	50,35	0,98	[46,23; 64,06]
	72h	27,88	0,97	[20,06; 31,42]
	96h	26,63	0,99	[23,21; 27,99]
TFK-1	24h	100,77	0,95	[82,39; 123,24]
	48h	48,65	0,99	[33,56; 53,22]
	72h	41,11	0,99	[26,97; 47,89]
	96h	39,26	0,99	[32,09; 42,24]

Através da observação da figura 3.1., verifica-se que a quercetina possui um efeito inibitório da proliferação celular em todas as linhas celulares em estudo, e que este efeito é dependente da concentração do composto e do tempo de incubação. Assim, verifica-se que o valor de IC_{50} diminui à medida que se aumenta o tempo de incubação com a quercetina, tanto para as linhas celulares de CHC, como para a linha celular de CC.

Observando os valores de IC_{50} presentes na tabela 3.1. constata-se que, para tempos de incubação mais curtos, a linha celular HepG2 é a mais sensível ao composto em estudo, apresentando os valores de IC_{50} mais baixos para as 24 e 48 horas de incubação. Porém, para tempos mais longos, ou seja, para as 72 e 96 horas de incubação, os valores mais baixos de IC_{50} são obtidos com a linha celular Hep3B2.1-7.

Para a linha celular HepG2, verifica-se que após 24 ou 48 horas de incubação, são necessários, respetivamente, 45,53 μM ou 37,67 μM de quercetina para obter o IC_{50} , não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estes dois tempos de incubação. Igualmente às 72 e 96 horas de incubação o valor de IC_{50} diminui gradualmente, sendo necessários, respetivamente, 33,06 μM e 29,02 μM , para inibir a proliferação celular em 50%. No entanto, também entre estes tempos de incubação não existem diferenças estatísticas. Apesar disso, entre os valores de IC_{50} obtidos após 48 e 72 horas de incubação, verificam-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

A linha celular HuH7 é aquela que se mostra mais resistente à quercetina. Para esta linha celular foi possível calcular os valores de IC_{50} que correspondem a 174,26 μM para as 24 horas de incubação, 90,60 μM para as 48 horas, 72,21 μM para as 72 horas e 61,81 μM para as 96 horas. Verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de incubação de 24 e de 48 horas ($p < 0,001$), de 24 e de 72 horas ($p < 0,001$), de 48 e de 72 horas ($p < 0,001$) e entre de 48 e de 96 horas ($p < 0,01$).

Para os tempos de incubação de 24 e de 48 horas, a linha celular Hep3B2.1-7 possui valores de IC_{50} intermédios entre as restantes linhas celulares de CHC, com valores de 87,07 μM e de 50,35 μM , respetivamente. Curiosamente, após 72 e 96 horas de incubação, é esta a linha celular que apresenta os valores de IC_{50} mais reduzidos (27,88 μM e 26,63 μM , respetivamente). De referir que se encontram diferenças com significado estatístico entre os valores de IC_{50} obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7 entre as 24 e as 72 horas de incubação ($p < 0,001$), as 24 e as 96 horas ($p < 0,01$), as 48 e as 72 horas ($p < 0,001$) e entre as 48 e as 96 horas de incubação ($p < 0,001$).

No que diz respeito à linha celular TFK-1, o valor de IC_{50} após 24 horas de incubação (100,77 μM) não é significativamente diferente do valor de IC_{50} obtido às 48 horas (48,65 μM). O mesmo acontece entre os valores obtidos às 24 e as 96 horas, onde o valor de IC_{50} obtido foi de 39,26 μM . No entanto, existem diferenças com significado estatístico entre os valores obtidos às 24 horas e às 72 horas de incubação (41,11 μM) ($p < 0,01$). Também se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de incubação 48 e 72 horas ($p < 0,001$).

No que respeita à comparação entre os valores de IC_{50} obtidos para todas as linhas celulares após 48 horas de incubação, verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares HepG2 e HuH7 ($p < 0,001$), também entre as linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 ($p < 0,05$), assim como entre as linhas celulares HepG2 e TFK-1 ($p < 0,05$) e entre as linhas celulares HuH7 e TFK-1 ($p < 0,01$).

3.1.2. SORAFENIB

Para determinar o efeito citotóxico do sorafenib nas linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, as culturas celulares foram incubadas com concentrações crescentes deste composto que variaram entre os 0,25 μM e os 100 μM . Os gráficos da figura 3.2. representam as curvas dose-resposta obtidas a partir do tratamento com sorafenib nas linhas celulares HepG2 (figura 3.2. A), HuH7 (figura 3.2. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.2. C) e TFK-1 (figura 3.2. D) após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

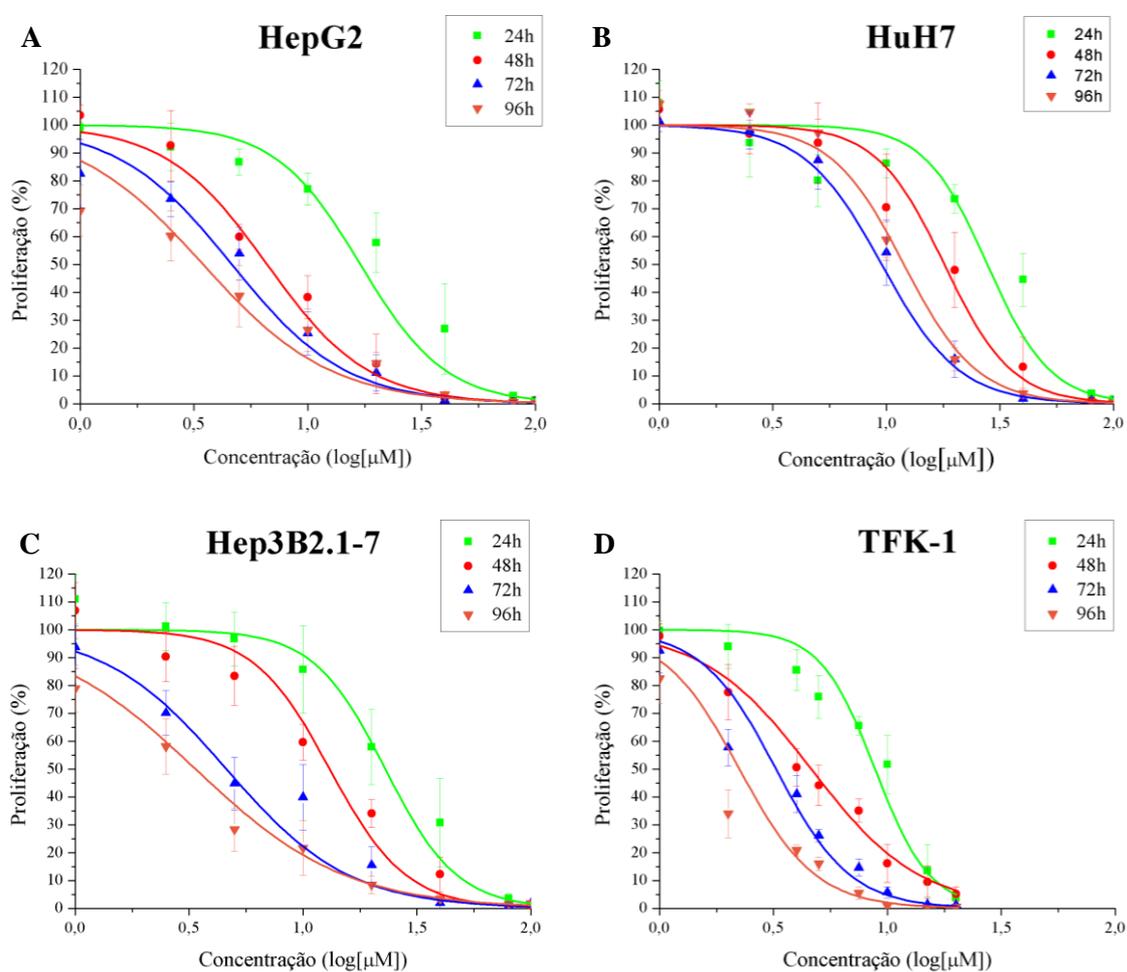


Figura 3.2.: Curvas dose-resposta das quatro linhas celulares em estudo em resposta à incubação com sorafenib. Avaliação da proliferação pelo ensaio do MTT 24, 48, 72 e 96 horas após incubação com concentrações crescentes de sorafenib nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes.

As curvas dose-resposta apresentadas permitiram calcular os valores de IC₅₀ mostrados na tabela 3.2.

Tabela 3.2.: Valores de IC₅₀, r² e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando incubadas com sorafenib para os diferentes tempos de incubação.

Linha celular	Tempos de incubação	IC ₅₀ (µM)	r ²	Intervalo de confiança (µM)
HepG2	24h	17,01	0,99	[13,83; 20,92]
	48h	6,62	0,99	[5,46; 7,10]
	72h	4,63	0,99	[3,60; 5,08]
	96h	3,46	0,97	[2,17; 4,10]
HuH7	24h	27,79	0,99	[22,73; 33,97]
	48h	17,99	0,99	[13,32; 20,05]
	72h	9,53	0,99	[6,90; 10,71]
	96h	11,94	0,99	[9,98; 12,74]
Hep3B2.1-7	24h	22,96	0,99	[17,75; 29,68]
	48h	13,08	0,99	[10,78; 14,03]
	72h	4,60	0,99	[3,43; 5,12]
	96h	3,37	0,99	[2,65; 3,68]
TFK-1	24h	8,82	0,99	[8,10; 9,60]
	48h	4,63	0,99	[4,07; 4,85]
	72h	3,24	0,98	[2,71; 3,46]
	96h	2,24	0,95	[1,76; 2,44]

Ao observar a figura 3.2., verifica-se que o sorafenib possui um efeito mais evidente que a quercetina na inibição da proliferação celular para todas as linhas celulares em estudo, e que este efeito é dependente da concentração de composto utilizada e do tempo de incubação. Com exceção da linha celular HuH7, verifica-se que à medida que se aumenta o tempo de incubação o valor de IC₅₀ diminui.

Através dos valores de IC₅₀ presentes na tabela 3.2. é possível verificar que para a linha celular HepG2, após 24 e 48 horas de incubação, são necessários, respetivamente, 17,01 µM e 6,62 µM de sorafenib para obter o IC₅₀. Igualmente após 72 e 96 horas de incubação o valor de IC₅₀ diminui gradualmente, sendo necessários,

respetivamente, 4,63 μM e 3,46 μM do fármaco em estudo, para inibir a proliferação celular em 50%. Existem diferenças com significado estatístico entre todos os valores obtidos para todos os tempos de incubação, exceto entre as 24 e 96 horas de incubação e entre as 72 e 96 horas.

A linha celular HuH7 é aquela que se mostra mais resistente ao sorafenib, uma vez que são necessárias concentrações superiores deste composto para que a proliferação celular seja inibida em 50%. Para esta linha celular foi possível calcular os valores de IC_{50} que correspondem a 27,79 μM para as 24 horas de incubação, 17,99 μM para as 48 horas, 9,53 μM para as 72 horas e 11,94 μM para as 96 horas. Existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos para todos os tempos de incubação, exceto entre as 24 e 48 horas, bem como entre as 48 e 96 horas. A linha HuH7 apresenta um decréscimo do valor de IC_{50} à medida que aumenta o tempo de incubação com o referido composto, observando-se, excepcionalmente, um aumento do valor de IC_{50} após 96 horas de incubação com o sorafenib.

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, após 24 e 48 horas de incubação com sorafenib, os valores de IC_{50} obtidos foram de 22,96 μM e 13,08 μM , respetivamente. Por sua vez, após 72 e 96 horas de incubação, obtiveram-se os valores de IC_{50} de 4,60 μM e 3,37 μM , respetivamente. Observam-se diferenças estatisticamente significativas entre os valores de IC_{50} obtidos para todos os tempos de incubação, exceto entre as 72 e 96 horas.

A linha celular TFK-1 é a linha celular mais sensível ao fármaco em estudo, apresentando os valores mais reduzidos de IC_{50} para todos os tempos de incubação, nomeadamente 8,82 μM para a avaliação às 24 horas, 4,63 μM para as 48 horas, 3,24 μM para as 72 horas e 2,24 μM para as 96 horas. O valor de IC_{50} obtido às 24 horas é significativamente diferente do valor de IC_{50} obtido às 48 horas ($p < 0,001$), às 72 horas ($p < 0,001$) e às 96 horas ($p < 0,01$), assim como acontece entre os tempos de incubação de 48 e 72 horas ($p < 0,001$) e os tempos 48 e 96 horas ($p < 0,001$).

Relativamente à comparação entre os valores de IC_{50} obtidos para todas as linhas celulares em estudo após 48 horas de incubação com sorafenib, verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre todas as linhas celulares, exceto entre as linhas HepG2 e TFK-1.

3.1.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DA QUERCETINA COM O SORAFENIB

Uma vez estudado o efeito citotóxico da quercetina e do sorafenib isoladamente, procedeu-se ao estudo do efeito combinado dos mesmos. A fim de verificar o efeito provocado pelo desfasamento temporal existente entre a adição dos dois compostos, efectuaram-se estudos onde ambos os compostos foram adicionados em simultâneo, assim como estudos onde a adição de sorafenib foi feita 2 horas após a adição de quercetina e, por fim, estudos onde ocorreu um desfasamento de 24 horas entre a incubação com quercetina e a incubação com sorafenib.

Os gráficos da figura 3.3. representam as curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado com quercetina e sorafenib para as linhas celulares HepG2 (figura 3.3. A), HuH7 (figura 3.3. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.3. C) e TFK-1 (figura 3.3. D).

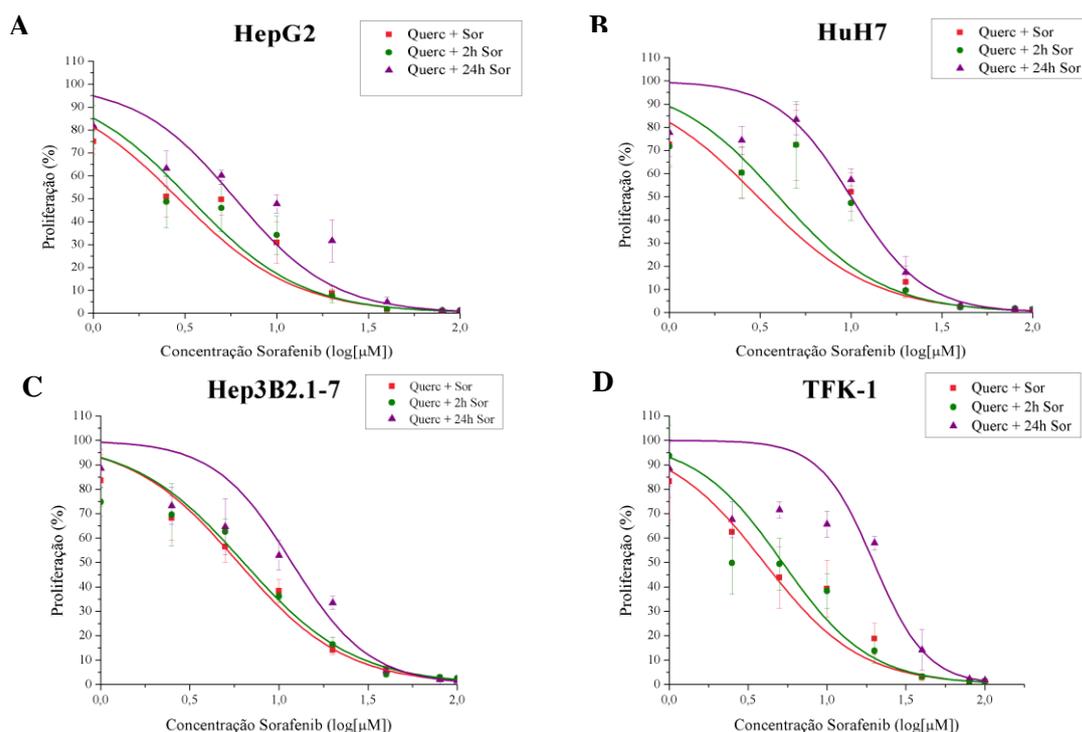


Figura 3.3.: Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento combinado de quercetina e sorafenib nas quatro linhas celulares em estudo. A incubação das culturas celulares com quercetina foi feita durante 48 horas, seguindo-se a sua combinação com diferentes concentrações de sorafenib em três etapas diferentes, simultaneamente, 2 horas e 24 horas após a adição da quercetina.

Os gráficos representam os resultados obtidos para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de seis experiências independentes.

As curvas dose-resposta traçadas permitiram calcular os valores de IC₅₀ para cada uma das condições estudadas. Os valores obtidos para as quatro linhas celulares em estudo estão representadas na tabela 3.3..

Tabela 3.3.: Valores de IC₅₀, r² e intervalos de confiança obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, quando tratadas em combinação com quercetina e sorafenib para as diferentes condições testadas.

Linha celular	Condição	IC ₅₀ (µM)	r ²	Intervalo de confiança (µM)
HepG2	Quercetina	37,67	0,98	[31,24; 43,82]
	Sorafenib	6,62	0,99	[5,46; 7,10]
	Querc. + Sor.	9,42 Querc. + 2,92 Sor.	0,97	[1,95; 3,38]
	Querc. + 2h Sor.	9,42 Querc. + 3,37 Sor.	0,96	[2,18; 3,94]
	Querc. + 24h Sor.	9,42 Querc. + 5,94 Sor.	0,97	[4,11; 6,79]
HuH7	Quercetina	90,60	0,98	[79,35; 101,44]
	Sorafenib	17,99	0,99	[13,32; 20,05]
	Querc. + Sor.	22,65 Querc. + 3,08 Sor.	0,86	[1,28; 4,23]
	Querc. + 2h Sor.	22,65 Querc. + 4,00 Sor.	0,87	[1,83; 5,30]
	Querc. + 24h Sor.	22,65 Querc. + 9,99 Sor.	0,97	[7,44; 11,11]
Hep3B2.1-7	Quercetina	50,35	0,98	[46,23; 74,63]
	Sorafenib	13,08	0,99	[10,78; 14,03]
	Querc. + Sor.	12,59 Querc. + 5,91 Sor.	0,99	[4,97; 6,29]
	Querc. + 2h Sor.	12,59 Querc. + 6,33 Sor.	0,97	[4,94; 6,93]
	Querc. + 24h Sor.	12,59 Querc. + 11,80 Sor.	0,97	[8,86; 13,10]
TFK-1	Quercetina	48,65	0,99	[33,56; 66,04]
	Sorafenib	4,63	0,99	[4,07; 4,85]
	Querc. + Sor.	12,16 Querc. + 3,99 Sor.	0,99	[2,63; 4,64]
	Querc. + 2h Sor.	12,16 Querc. + 5,22 Sor.	0,99	[3,39; 6,10]
	Querc. + 24h Sor.	12,16 Querc. + 19,76 Sor.	0,91	[14,05; 22,36]

A avaliação do efeito produzido pela combinação da quercetina com o sorafenib pelo método de Chou e Talalay resultou nos índices de combinação descritos na tabela 3.4..

Tabela 3.4.: Índices de combinação obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 pelo método de Chou e Talalay.

	Índice de Combinação			
	HepG2	HuH7	Hep3B2.1-7	TFK-1
Querc. + Sor.	0,69	0,42	0,70	1,11
Querc. + 2h Sor.	1,40	1,55	1,32	1,56
Querc. + 24h Sor.	2,01	2,75	2,11	4,04

Verifica-se, para todas as linhas celulares em estudo, que ocorre um aumento dos valores de IC₅₀ obtidos à medida que se prolonga o tempo de espera entre a adição de quercetina e a adição de sorafenib. A linha celular HuH7 é a que apresenta maior sensibilidade ao tratamento combinado, já que, considerando por exemplo a adição dos dois compostos em simultâneo, se verifica um decréscimo acentuado da concentração de sorafenib necessária para atingir o IC₅₀ relativamente à adição do sorafenib isolado, tendo passado de 17,99 µM para 3,08 µM.

Relativamente à linha celular HepG2, ao adicionar-se 37,67 µM de quercetina conseguiu-se sensibilizar as células para o sorafenib, uma vez que quando os compostos foram adicionados em simultâneo o valor de IC₅₀ do sorafenib reduziu de uma forma estatisticamente significativa de 6,62 µM para 2,92 µM (p<0,01). Quando os dois compostos foram adicionados com um intervalo de duas horas reduziu-se significativamente o valor de IC₅₀ do sorafenib para 3,37 µM (p<0,05). No entanto, não se observaram diferenças significativas quando se adiciona o sorafenib 24 horas após a exposição à quercetina, ocorrendo um decréscimo do valor de IC₅₀ do sorafenib para 5,94 µM. Através do método de Chou e Talalay (tabela 3.4.) verifica-se que existe sinergia aquando da adição simultânea dos dois compostos.

Já para a linha HuH7, com a adição de 90,60 µM de quercetina ocorreu uma redução, com diferenças estatisticamente significativas, do valor de IC₅₀ do sorafenib (17,99 µM) em todas as diferentes etapas de combinação podendo, desta forma, de facto atribuir-se a maior sensibilidade ao tratamento combinado a esta linha celular. Na adição simultânea dos dois compostos em estudo reduziu-se o valor de IC₅₀ de sorafenib de 17,99 µM para 3,08 µM (p<0,01) e para as adições 2 e 24 horas após o tratamento com quercetina, os valores de IC₅₀ de sorafenib reduziram para 4,00 µM (p<0,01) e 9,99

μM ($p < 0,05$), respetivamente. Observando a tabela 3.4. verifica-se que ocorre sinergia quando os dois compostos são adicionados simultaneamente.

No que respeita à linha celular Hep3B2.1-7, ao adicionarem-se $50,35 \mu\text{M}$ de quercetina conseguiu-se reduzir o valor de IC_{50} do sorafenib ($13,08 \mu\text{M}$) com significado estatístico, tanto na adição simultânea, que resultou num valor de $5,91 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$), como quando adicionado 2 horas depois resultando num valor de $6,33 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$). Porém, embora tenha ocorrido um decréscimo no valor de IC_{50} do sorafenib quando se adicionou este fármaco 24 horas após a incubação com quercetina ($11,80 \mu\text{M}$) este resultado não apresentou diferenças com significado estatístico. Tal como havia acontecido para as outras linhas celulares de CHC em estudo, verifica-se também aqui, que existe sinergia quando os dois fármacos são adicionados em simultâneo (tabela 3.4.).

Em relação à linha celular TFK-1, utilizando $48,65 \mu\text{M}$ de quercetina, apenas se conseguiu reduzir o valor de IC_{50} do sorafenib ($4,63 \mu\text{M}$) quando os dois compostos foram adicionados em simultâneo, obtendo-se o valor de $3,99 \mu\text{M}$, embora sem diferenças significativas. Curiosamente, quando a adição foi efetuada 2 e 24 horas após a exposição à quercetina, ocorreu um aumento do valor do IC_{50} para $5,22 \mu\text{M}$, no primeiro caso, embora sem significância estatística, e um aumento com diferenças estatisticamente significativas no segundo caso para $19,76 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$). De facto, ao observar a tabela 3.4., verifica-se que nunca se obteve sinergia ao estudar o efeito combinado da quercetina e do sorafenib nesta linha celular.

3.2. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR PELO ENSAIO CLONOGÉNICO

De modo a avaliar a sobrevivência celular em resposta à quercetina, foram realizados ensaios clonogénicos em todas as linhas celulares em estudo, sendo testadas as condições descritas na tabela 2.1.. Os gráficos da figura 3.4. expressam o fator de sobrevivência calculado em relação às culturas controlo, obtido para as condições estudadas, nas linhas celulares HepG2 (figura 3.4. A), HuH7 (figura 3.4. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.4. C) e TFK-1 (figura 3.4. D).

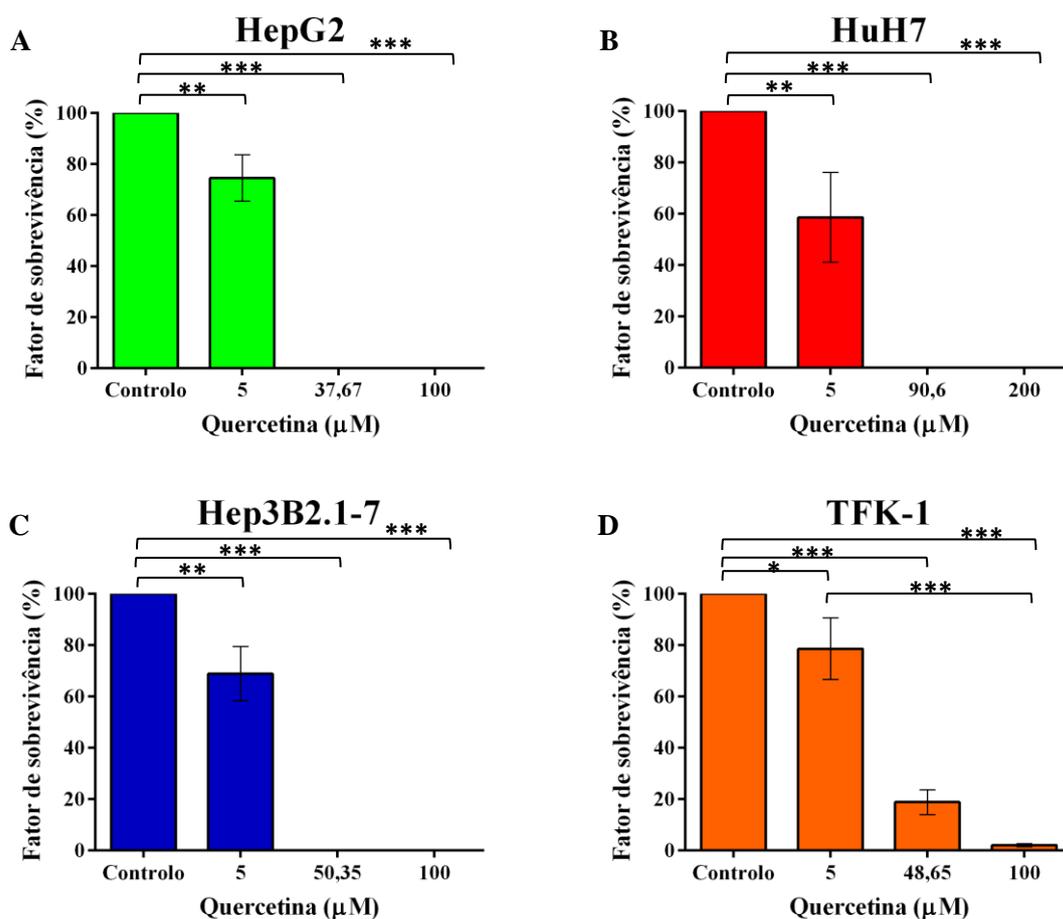


Figura 3.4.: Análise da viabilidade celular, em resposta à quercetina, pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) através do ensaio clonogénico. As culturas celulares foram submetidas aos tratamentos apresentados na tabela 2.1., e a formação de colónias foi quantificada ao 12º dia após o tratamento. O gráfico expressa a percentagem de colónias formadas em relação ao controlo, assim como as respetivas médias e os desvios padrão de seis experiências independentes. As diferenças significativas estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

O tratamento com diferentes concentrações de quercetina introduziu alterações significativas ao nível da capacidade de formação de colónias em todas as linhas celulares em estudo.

Nas linhas HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7, com apenas 5 µM de quercetina, verificou-se uma redução de cerca de 20-25% da capacidade de formação de colónias relativamente ao controlo, sempre com diferenças estatisticamente significativas,

verificando-se, de seguida, a ausência de formação de colónias quando se utilizou o valor de quercetina correspondente ao IC₅₀, bem como o valor superior.

Para a linha celular TFK-1, o tratamento com a menor concentração de quercetina utilizada (5 µM) induziu também uma diminuição significativa (cerca de 20%) do fator de sobrevivência (p<0,05). Relativamente aos restantes tratamentos podemos constatar que, com a concentração correspondente ao IC₅₀, assim como com concentração superior a esta, para esta linha, se verifica uma perda significativa da capacidade de formação de colónias superior a 80% (p<0,001). Quando comparadas as condições de tratamento com quercetina entre si, apenas se verificam diferenças significativas entre as concentrações de 5 µM e de 100 µM (p<0,001).

3.3. CITOMETRIA DE FLUXO

3.3.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E TIPOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA

A viabilidade celular foi analisada com recurso à dupla marcação com AV-FITC e IP por citometria de fluxo. Os gráficos da figura 3.5. representam as diferentes populações identificadas (células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia/necrose e células em necrose) em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (figura 3.5. A), HuH7 (figura 3.5. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.5. C) e TFK-1 (figura 3.5. D).

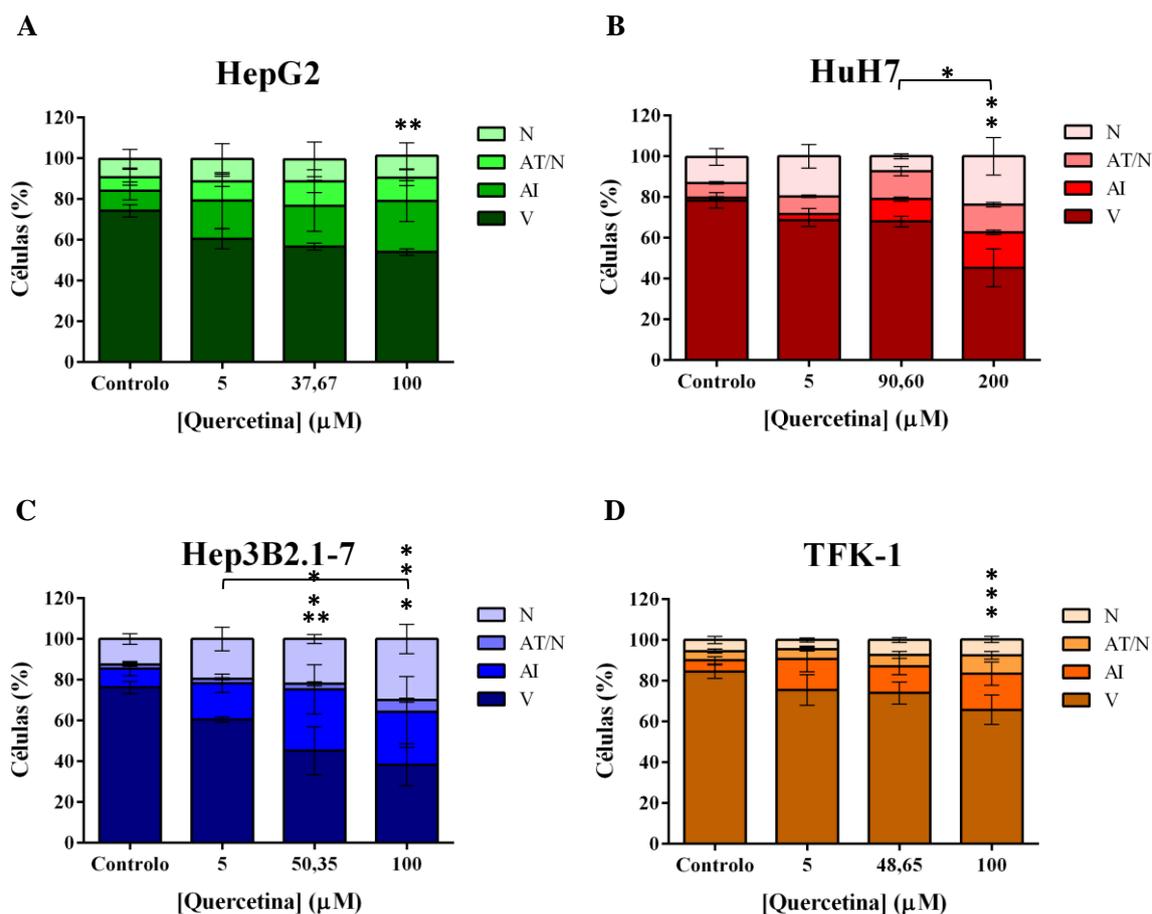


Figura 3.5.: Análise da viabilidade celular, por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação AV-FITC e IP, após incubação com diferentes concentrações de quercetina, durante 48 horas, nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *, sendo que estas se apresentam segundo a ordem V, AI, AT/N, N. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

A análise da figura 3.5. A permite-nos verificar que, em resposta à incubação com quercetina, a linha celular HepG2 possui uma maior tendência para ativar a morte celular por apoptose.

Quando as células são incubadas durante 48 horas com 37,67 µM deste composto, concentração que corresponde ao valor do IC_{50} , estas células mantiveram aproximadamente 60% da viabilidade, à semelhança do que acontece para a menor concentração de quercetina utilizada, bem como quando se aumenta a dose do composto

para 100 μM . Apenas se verificam diferenças significativas ($p < 0,01$) entre a condição controle e a maior concentração de quercetina utilizada, no que diz respeito à percentagem de células viáveis (figura 3.5. A).

Por sua vez, para a linha celular HuH7, quando as células foram incubadas com quercetina, nomeadamente com 5 μM e com 90,60 μM , a viabilidade celular manteve-se semelhante à verificada no controle, observando-se porém que ao aumentar a dose do composto, existe uma tendência para ativar a morte celular por apoptose. Para a maior concentração de quercetina utilizada, a viabilidade celular decresceu para cerca de 40%, e de entre as células que morreram existe um balanço entre a necrose e a apoptose. Em relação aos resultados obtidos com esta linha celular, existem diferenças estatisticamente significativas nas células viáveis entre o controle e as tratadas com 200 μM ($p < 0,05$), nas células em apoptose inicial também entre o controle e a condição que utilizou 200 μM ($p < 0,05$) e nas células em necrose entre os 90,60 μM e os 200 μM ($p < 0,05$) (figura 3.5. B).

No que respeita à linha celular Hep3B2.1-7, verifica-se que quando as células foram incubadas com quercetina na concentração correspondente ao IC_{50} (50,35 μM), apenas cerca de 45% das células permaneceram viáveis ($p = 0,001$), enquanto que cerca de 20% morreram por necrose e outras 35% por apoptose ($p < 0,05$). Aumentando a concentração do composto para 100 μM , existe apenas uma ligeira diminuição da percentagem das células viáveis em relação à condição anterior e a percentagem da população celular em apoptose inicial ($p < 0,05$) tende a igualar-se com a percentagem de células em necrose ($p < 0,01$). Verificaram-se ainda diferenças estatisticamente significativas para as populações de células viáveis entre a condição controle e 100 μM ($p < 0,001$) e entre 5 μM e 100 μM ($p < 0,05$) (figura 3.5. C).

Para a linha celular TFK-1, é possível observar que não existe uma indução evidente da morte celular, pois mesmo com a adição de 100 μM de quercetina, a viabilidade celular é de cerca de 65%. Verificam-se, porém, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as populações de células viáveis da condição controle e das células incubadas com 100 μM de quercetina. Consegue-se ainda verificar que quando ocorre morte esta é essencialmente por apoptose, observando-se ainda diferenças com significado estatístico nas células em apoptose inicial entre a condição controle e 100 μM ($p < 0,05$) e nas células em apoptose tardia/necrose também entre o controle e 100 μM ($p < 0,05$) (figura 3.5. D).

3.3.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BAX E BCL-2

A fim de determinar a relação entre a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 recorreu-se à citometria de fluxo. Os gráficos da figura 3.6. representam os valores da razão Bax/Bcl-2 obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (figura 3.6. A), HuH7 (figura 3.6. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.6. C) e TFK-1 (figura 3.6. D).

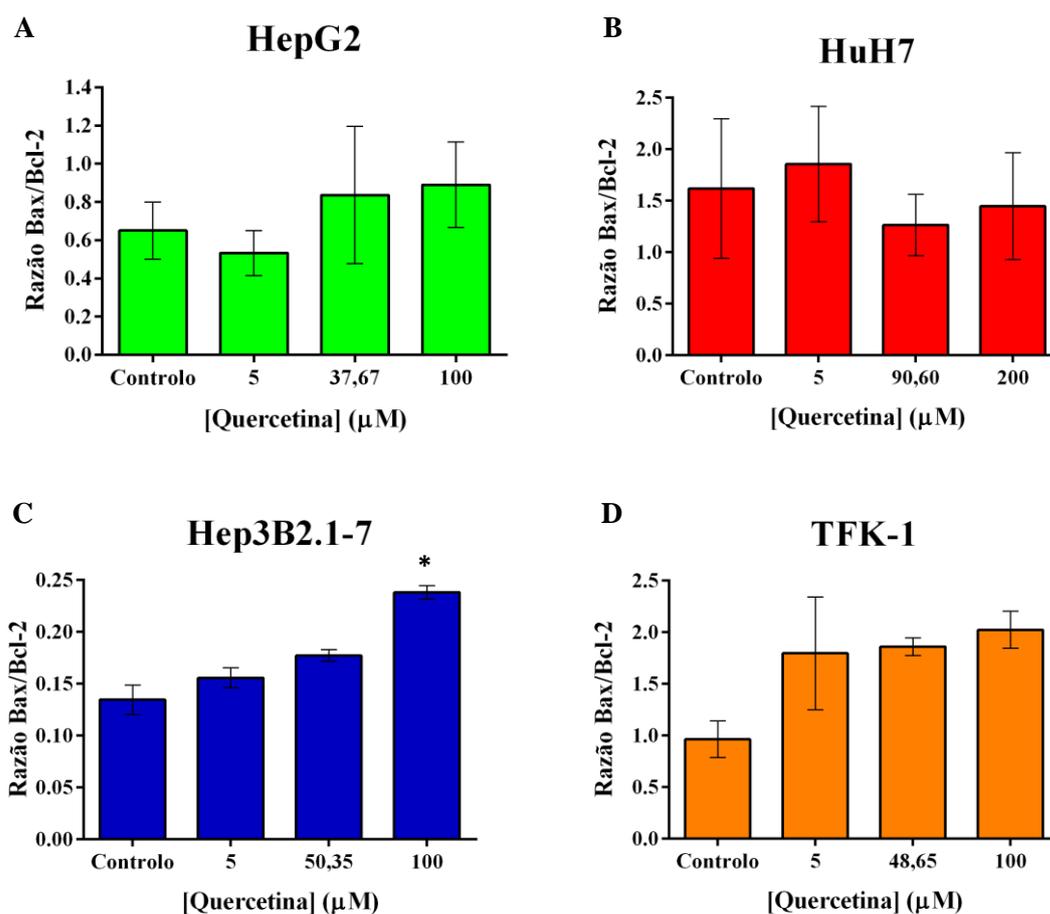


Figura 3.6.: Análise da razão da expressão entre a Bax e a Bcl-2 em resposta à quercetina nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D). Os resultados apresentados são expressos em razão Bax/Bcl-2 para cada uma das condições em estudo. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$.

Ao observar a figura 3.6., verifica-se que, relativamente ao controlo, o tratamento com quercetina tende a induzir um aumento da razão Bax/Bcl-2 para todas as linhas celulares em estudo, exceto para a linha celular HuH7, sendo este aumento mais evidente na linha celular TFK-1. Este aumento significa que há uma maior expressão da proteína pró-apoptótica em relação à anti-apoptótica, em resposta ao composto em estudo. No entanto, apenas se observam diferenças com significado estatístico para a linha celular Hep3B2.1-7 entre a condição controlo e as células tratadas com 100 μ M de quercetina.

Na linha celular HepG2, quando as células são incubadas com a concentração correspondente ao IC₅₀ e com a concentração superior a este, observa-se uma tendência para o aumento da razão Bax/Bcl-2. Verifica-se também que, tanto para a condição controlo como para as concentrações de quercetina testadas, a razão Bax/Bcl-2 é sempre inferior a 1, o que significa que existe uma maior expressão de Bcl-2 em relação à expressão de Bax.

Já para a linha celular HuH7, apenas se verifica aumento da razão Bax/Bcl-2, em relação ao controlo, quando se incubam as células com 5 μ M de quercetina. Para esta linha celular, independentemente da condição os valores da razão Bax/Bcl-2 são sempre superiores a 1, o que indica uma maior expressão da proteína Bax do que Bcl-2.

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, é possível observar uma tendência para um aumento gradual da razão Bax/Bcl-2 à medida que se utilizam concentrações crescentes de quercetina, com significado estatístico entre o controlo e os 100 μ M de composto ($p < 0,05$). Porém, nesta linha verifica-se que os valores da razão Bax/Bcl-2 são sempre inferiores a 1, indicando uma maior expressão de Bcl-2 relativamente à Bax.

Para a linha celular TFK-1, ocorre um evidente aumento da razão Bax/Bcl-2 nas células sujeitas a tratamento com quercetina relativamente ao controlo. Na condição controlo, é possível verificar que a razão Bax/Bcl-2 é aproximadamente 1, o que significa que existe um balanço entre a expressão das duas proteínas, no entanto, quando se expõem as células à quercetina observa-se o referido aumento da razão Bax/Bcl-2. Aumento esse que se manteve praticamente constante para todas as concentrações utilizadas.

3.3.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

A quantidade de fluorescência emitida por células marcadas com iodeto de propídeo permite conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular. Neste sentido, os gráficos da figura 3.7. representam as populações em cada uma das fases do ciclo celular para as linhas HepG2 (figura 3.7. A), HuH7 (figura 3.7. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.7. C) e TFK-1 (figura 3.7. D), nas diferentes condições testadas.

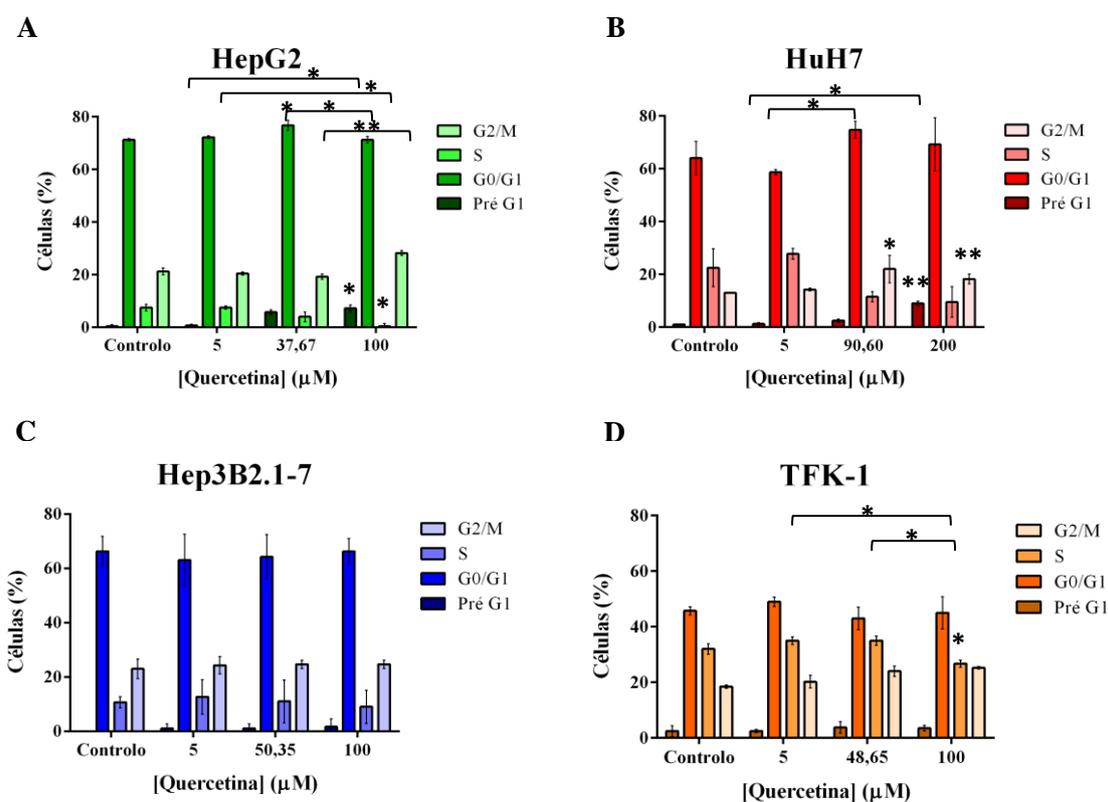


Figura 3.7.: Avaliação das populações celulares em cada uma das fases do ciclo celular para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) para as diferentes condições testadas. Na figura estão representadas as populações em fase pré-G1, G0/G1, S e G2/M. Para cada condição, os resultados são expressos em percentagem de células. Os resultados exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

Nos resultados obtidos para a linha celular HepG2, é importante referir o aparecimento do pico pré-G1, o pico pré-apoptótico, para as maiores concentrações de quercetina utilizadas, apresentando significado estatístico entre as células controlo e as células incubadas com 100 μM de quercetina ($p < 0,05$) e entre as células incubadas com 5 μM e com 100 μM deste composto ($p < 0,05$). De referir também que existem aumentos com diferenças significativas da população celular em fase G0/G1 entre a condição controlo e a incubação com a concentração correspondente ao IC_{50} ($p < 0,05$), bem como entre esta condição e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,05$), o que sugere um bloqueio nesta fase do ciclo celular. Observa-se também uma diminuição da população em fase S à medida que se aumenta a concentração de quercetina, verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre a condição controlo e os 100 μM ($p < 0,05$) e entre os 5 μM e os 100 μM ($p < 0,05$). Ocorre também um pequeno aumento da população em fase G2/M, apenas com diferenças estatisticamente significativas entre as células incubadas com 37,67 μM e com 100 μM de quercetina ($p < 0,01$) (figura 3.7. A).

Já para a linha celular HuH7, observa-se de igual forma o aparecimento do pico pré-G1, para as maiores concentrações de quercetina utilizadas, existindo significado estatístico entre o controlo e as células incubadas com 200 μM de quercetina ($p < 0,01$) e entre as células tratadas com 5 μM e com 200 μM deste composto ($p < 0,05$). Também se observa um ligeiro aumento da população celular em fase G0/G1 quando as células são incubadas com a concentração correspondente ao IC_{50} e superior a esta, com significado estatístico entre as concentrações de 5 μM e de 90,60 μM ($p < 0,05$). Observa-se também uma diminuição da população em fase S e aumento (sem significância estatística) da população celular na fase G2/M, onde se verificam diferenças significativas entre o controlo e a concentração correspondente ao IC_{50} ($p < 0,01$) e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,05$) (figura 3.7. B).

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, é possível observar um pequeno aumento gradual da população em fase pré-G1 à medida que se utilizam concentrações crescentes de quercetina, observando-se também uma ligeira diminuição da população em fase S para a maior concentração de quercetina utilizada, em relação às outras condições, sem existência de diferenças estatisticamente significativas (figura 3.7. C).

Para a linha celular TFK-1, não se verificam diferenças significativas na população em fase pré-G1. No entanto, observa-se a diminuição estatisticamente significativa da população em fase S entre as condições de 5 μM e de 100 μM ($p < 0,05$)

e entre os 48,65 μM e os 100 μM ($p < 0,05$). De referir também o aumento gradual da população em fase G2/M à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada relativamente ao controlo, observando-se diferenças significativas entre este e a maior concentração de quercetina utilizada ($p < 0,05$) (figura 3.7. D).

3.3.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO E DEFESAS ANTI-OXIDANTES

A produção intracelular de ROS foi avaliada através da determinação dos níveis intracelulares médios de peróxidos e de anião superóxido, sendo avaliada também a produção de defesas antioxidantes pela avaliação da expressão intracelular de glutatião reduzido (GSH).

3.3.4.1. Produção de Peróxidos

No que respeita à produção de peróxidos, os valores obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (figura 3.8. A), HuH7 (figura 3.8. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.8. C) e TFK-1 (figura 3.8. D) estão representadas nos gráficos da figura 3.8..

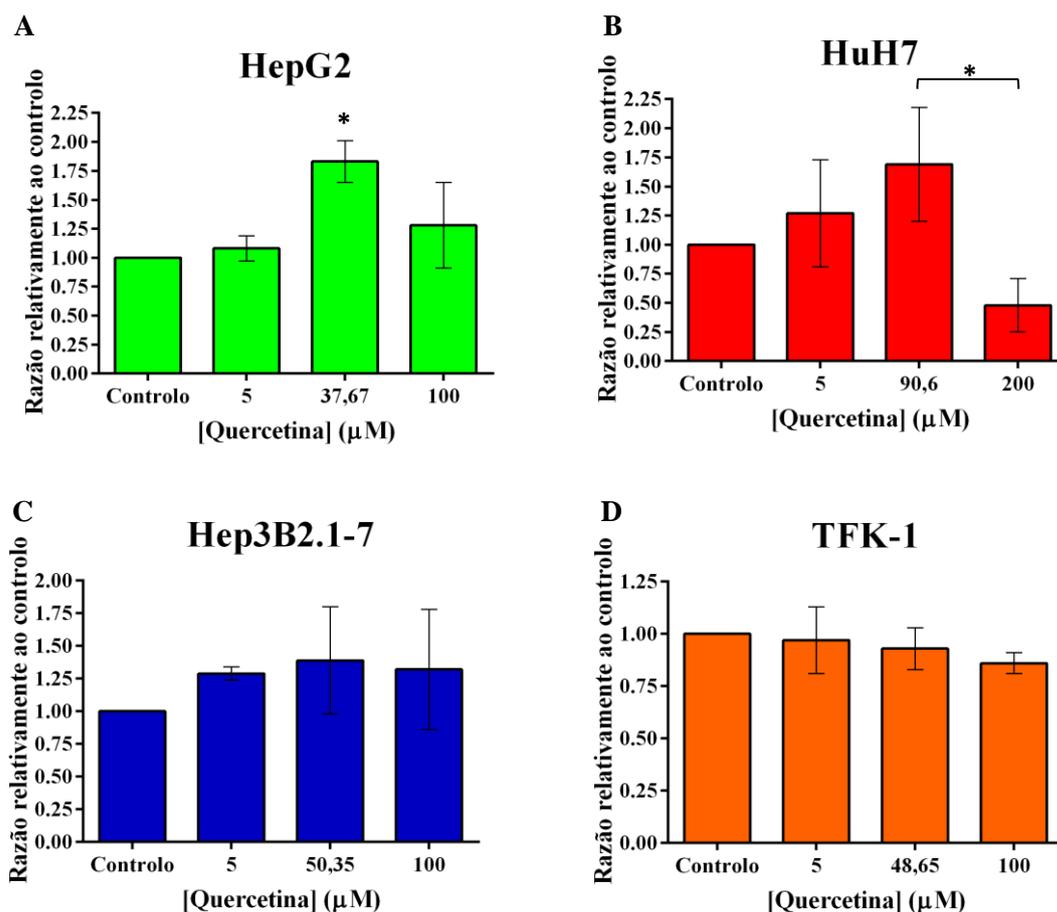


Figura 3.8.: Avaliação da produção de peróxidos pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes concentrações testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$.

Como se pode observar pelos gráficos da figura anterior, o tratamento com quercetina introduz alterações ao nível da produção intracelular de peróxidos.

Nas linhas celulares HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7, a produção de peróxidos aumenta gradualmente à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada até ao valor da concentração correspondente ao IC_{50} , apresentando significado estatístico no caso da linha celular HepG2 ($p < 0,05$) entre o controlo e a concentração de 37,67 μM . De seguida, também para as linhas celulares de CHC ocorre uma diminuição dos valores de peróxidos entre o valor correspondente ao IC_{50} e a maior concentração de quercetina utilizada, com significado estatístico no caso das células HuH7 ($p < 0,05$) (figura 3.8. A, figura 3.8. B e figura 3.8. C, respetivamente).

Em relação à linha celular TFK-1, embora sem significado estatístico, verifica-se uma ligeira diminuição da produção de peróxidos relativamente ao controlo, à medida que se utilizam concentrações crescentes de quercetina (figura 3.8. D).

3.3.4.2. Produção de Anião Superóxido

Os resultados alcançados para a produção de anião superóxido estão representados nos gráficos da figura 3.9. obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (figura 3.9. A), HuH7 (figura 3.9. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.9. C) e TFK-1 (figura 3.9. D).

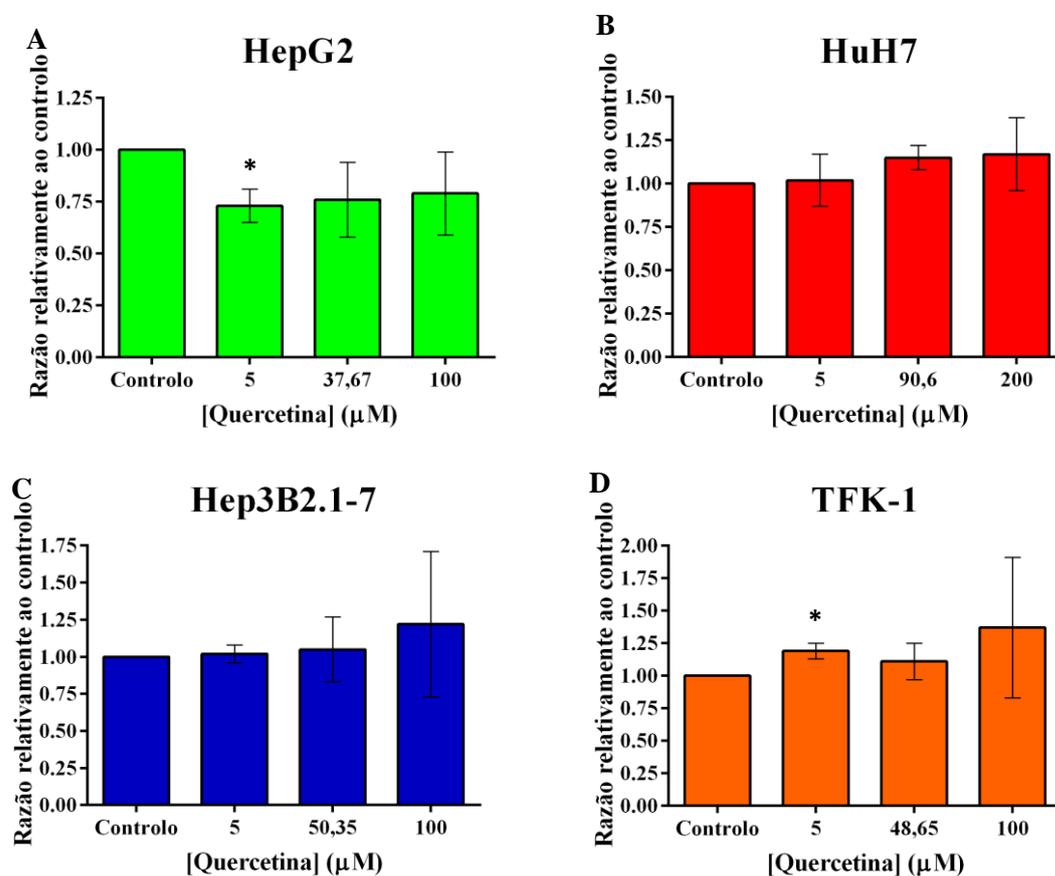


Figura 3.9.: Avaliação da produção de anião superóxido pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes condições testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$.

Os resultados obtidos permitem-nos verificar uma tendência para o aumento da produção do anião superóxido em resposta à quase totalidade dos tratamentos com quercetina utilizados, sendo a linha celular HepG2 a única exceção a estes resultados. Nesta linha celular observa-se uma diminuição da produção intracelular de anião superóxido relativamente ao controlo, diminuição esta que se mantém praticamente constante à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada (figura 3.9. A).

De referir as diferenças estatisticamente significativas verificadas nas linhas celulares HepG2 e TFK-1 entre a menor concentração de quercetina utilizada e a condição controlo ($p < 0,05$), sendo que, curiosamente a produção do anião superóxido diminui quando a linha celular HepG2 é incubada com 5 μM de quercetina e aumenta na linha celular TFK-1 para esta condição (figura 3.9. D).

Para as restantes linhas celulares, o aumento da produção do anião superóxido referido anteriormente é mais evidente para a maior concentração de quercetina utilizada, não existindo quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos para cada linha celular (figura 3.9. B e figura 3.9. C).

3.3.4.3. Produção de GSH Livre

Relativamente à avaliação da expressão intracelular de GSH, os resultados estão representados nos gráficos da figura 3.10. e foram obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (figura 3.10. A), HuH7 (figura 3.10. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.10. C) e TFK-1 (figura 3.10. D).

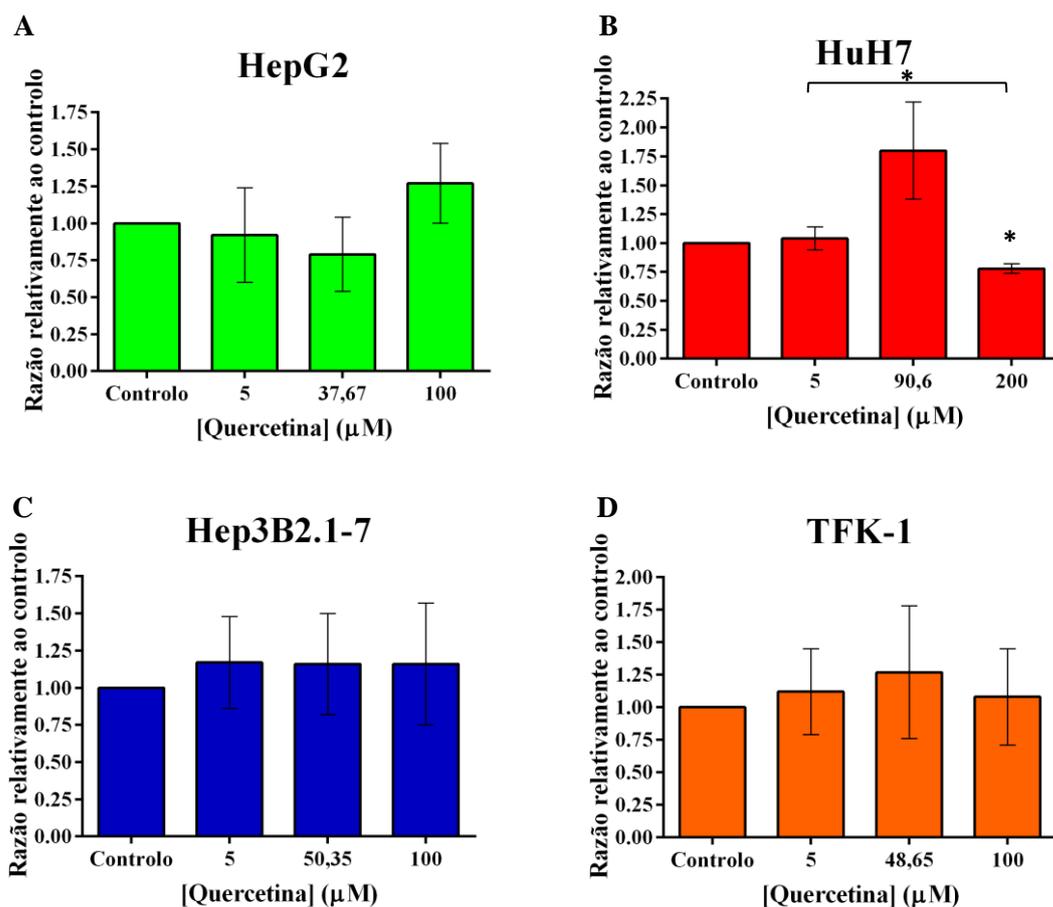


Figura 3.10.: Avaliação da concentração intracelular de GSH livre recorrendo à marcação com o alaranjado de mercúrio nas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) em resposta às diferentes condições testadas. Para cada condição, os resultados foram normalizados em relação ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$.

De uma forma geral, a expressão da GSH em resposta ao tratamento com quercetina tem tendência a estar aumentada, quando comparada com o controlo, isto para todas as linhas celulares em estudo, ocorrendo diferenças com significado estatístico apenas na linha celular HuH7.

Na linha HepG2, apenas se verifica um aumento da expressão da GSH para a maior concentração de quercetina utilizada, observando-se uma ligeira diminuição desta nas condições anteriores (figura 3.10. A).

Já nas linhas celulares HuH7 e TFK-1, é possível observar um aumento da expressão de GSH até ao valor da concentração correspondente ao IC_{50} , seguindo-se

uma diminuição desta para a concentração mais elevada de quercetina utilizada, sendo estes resultados mais evidentes para a linha HuH7, onde se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os 200 μM ($p < 0,05$) e entre os 5 μM e os 200 μM ($p = 0,01$) (figura 3.10. B e figura 3.10. D, respetivamente).

Para a linha Hep3B2.1-7, o aumento da expressão da GSH verifica-se logo para a menor concentração de quercetina utilizada, mantendo-se sensivelmente constante para os restantes tratamentos (figura 3.10. C).

3.3.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE GLUT-1

Para avaliar a expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1 recorreu-se à técnica de citometria de fluxo. Os gráficos da figura 3.11. representam os resultados obtidos em cada uma das condições testadas para as linhas celulares HepG2 (figura 3.11. A), HuH7 (figura 3.11. B), Hep3B2.1-7 (figura 3.11. C) e TFK-1 (figura 3.11. D).

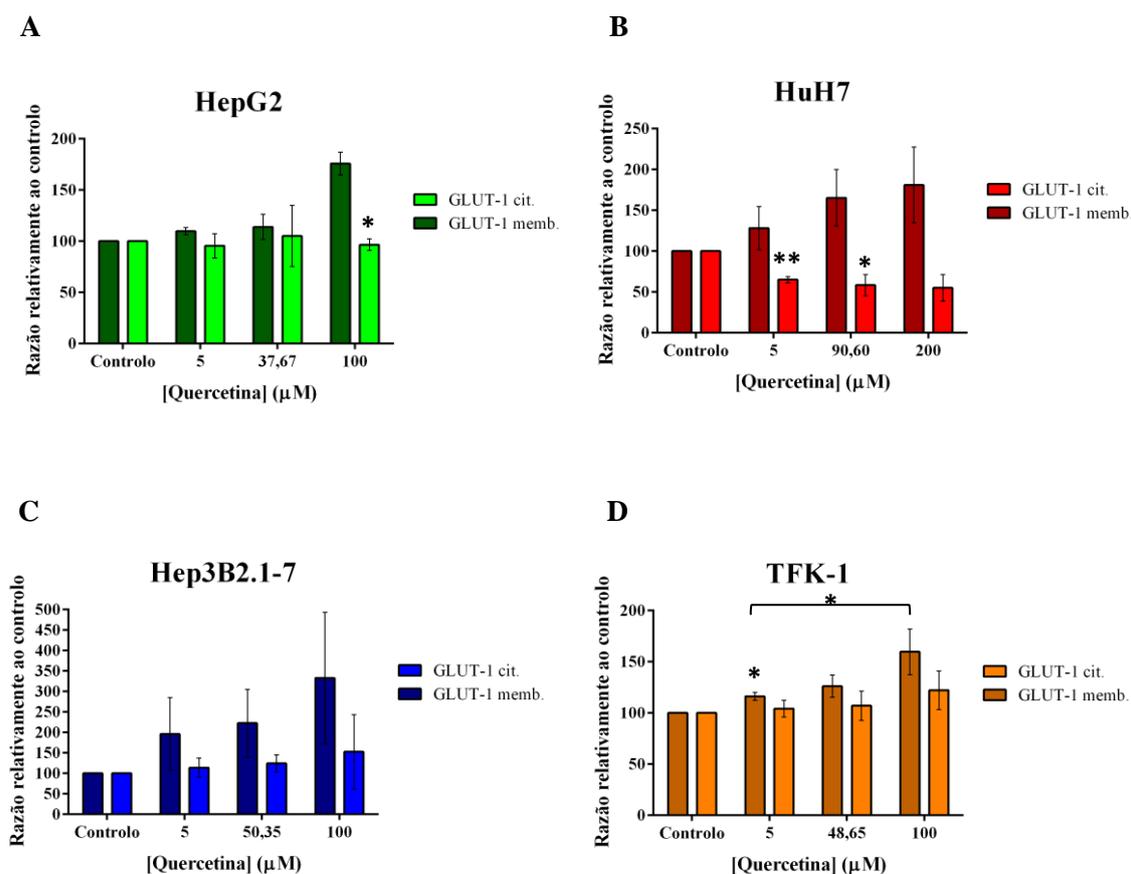


Figura 3.11.: Análise da expressão membranar e citoplasmática do GLUT-1 para as linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D) para as várias condições

testadas. Para cada condição, os resultados são expressos em percentagem relativamente ao controlo e exprimem a média e o desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com *. A utilização de * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$.

Através da análise da figura 3.11. A, podemos observar que, para a linha celular HepG2, existe um aumento da expressão membranar do GLUT-1 acompanhado por uma diminuição da expressão citoplasmática do mesmo, à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada. A diminuição da expressão citoplasmática apresenta diferenças com significado estatístico entre o controlo e os 100 μM de quercetina ($p < 0,05$).

Também para a linha celular HuH7, à medida que se aumenta a concentração de quercetina, ocorre um aumento da expressão membranar deste transportador, acompanhado de uma diminuição citoplasmática do mesmo. Os resultados são aqui mais evidentes do que os obtidos para a linha celular HepG2, observando-se diferenças significativas na expressão citoplasmática para a menor concentração de quercetina utilizada ($p < 0,001$) e para a concentração correspondente ao valor de IC_{50} ($p < 0,05$), relativamente ao controlo (figura 3.11. B).

Para as linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1, à medida que se aumenta a concentração de composto, também se verifica um aumento da expressão membranar do GLUT-1 relativamente ao controlo, com maior evidência na linha Hep3B2.1-7 mas que, no entanto, não apresenta diferenças com significado estatístico. No caso da linha celular TFK-1, ocorrem diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e os 5 μM de quercetina ($p < 0,05$) e entre esta última concentração e os 100 μM ($p < 0,05$). Porém, também se observa um ligeiro aumento da expressão citoplasmática deste transportador em ambas as linhas celulares, embora sem existência de diferenças significativas (figura 3.11. C e figura 3.11. D, respetivamente).

3.4. ESTUDOS DE CAPTAÇÃO DE ^{18}F -FDG

Os estudos de captação do radiofármaco ^{18}F -FDG permitiram estudar o perfil de captação do mesmo ao longo do tempo, e por analogia o perfil de captação de glicose, pelas linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1 e pelas mesmas linhas incubadas, previamente, durante uma hora com quercetina.

Considerando o modelo utilizado, é possível descrever as curvas utilizando os parâmetros A (captação máxima) e T (tempo necessário para que a captação seja igual a A/2), que se apresentam para cada condição na tabela 3.5..

Nos gráficos da figura 3.12. estão representados os perfis de captação de ^{18}F -FDG, nas quatro linhas celulares em estudo cultivadas em meio *high glucose* e *low glucose*, em situação controlo e aquando da pré-incubação com quercetina.

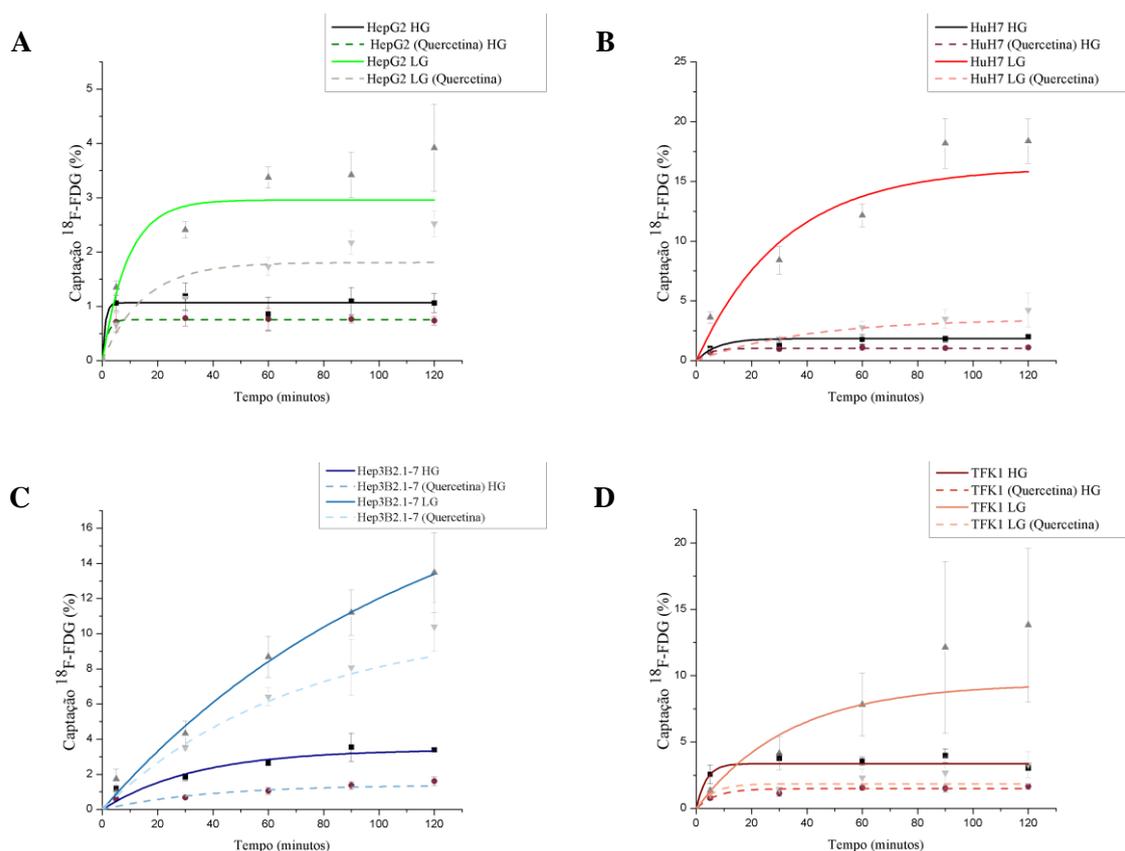


Figura 3.12.: Perfis de captação de ^{18}F -FDG pelas linhas celulares HepG2 (A), HuH7 (B), Hep3B2.1-7 (C) e TFK-1 (D), em células controlo e em células pré-incubadas com quercetina. As células foram cultivadas em meio *high glucose* (HG) e em meio *low glucose* (LG). Os resultados expressam a média e o desvio padrão de quatro experiências independentes realizadas em duplicado.

Tabela 3.5.: Valores dos parâmetros A e T, erros padrão e r^2 obtidos para as linhas celulares HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7 e TFK-1, para cada condição.

Linha celular	Glicose	Fármaco	Parâmetro	Média	Erro padrão	r^2
HepG2	LG	Sem Fármaco	A	1,07	0,06	0,99
		Fármaco	T	0,71	1,56	
		Quercetina	A	0,76	0,01	
	HG	Sem fármaco	T	1,25	0,35	0,96
		Fármaco	A	2,96	0,31	
		Quercetina	T	6,37	2,29	
HuH7	LG	Sem Fármaco	A	1,85	0,14	0,97
		Fármaco	T	5,22	2,65	
		Quercetina	A	1,04	0,03	
	HG	Sem Fármaco	T	3,10	0,60	0,99
		Fármaco	A	16,19	3,43	
		Quercetina	T	21,96	11,32	
Hep3B2.1-7	LG	Sem Fármaco	A	3,42	0,40	0,97
		Fármaco	T	23,46	10,10	
		Quercetina	A	1,40	0,81	
	HG	Sem Fármaco	T	26,45	26,68	0,82
		Fármaco	A	20,56	8,89	
		Quercetina	T	78,94	47,13	
TFK-1	LG	Sem Fármaco	A	10,59	4,31	0,98
		Fármaco	T	47,83	25,06	
		Quercetina	A	3,37	0,20	
	HG	Sem Fármaco	T	2,42	2,02	0,98
		Fármaco	A	1,49	0,11	
		Quercetina	T	4,98	1,60	
HG	Sem Fármaco	A	9,41	2,82	0,96	
	Fármaco	T	23,40	8,65		
	Quercetina	A	1,86	0,36		
			T	4,20	2,51	0,88

Através da observação dos gráficos da figura 3.12., podemos verificar que, na generalidade, existe uma maior percentagem de captação do radiofármaco quando as células são cultivadas em meio *low glucose*. Por outro lado, verifica-se também que em todas as linhas celulares em estudo existe uma diminuição da percentagem de captação de ^{18}F -FDG nas células incubadas previamente com quercetina quando comparadas com as células controlo, tal como se pode verificar pelos maiores valores do parâmetro A

(captação máxima) atribuídos às células que não foram previamente incubadas com quercetina. No que diz respeito ao parâmetro T, nunca se verificam diferenças estatisticamente significativas, o que significa que a quercetina induz uma diminuição na percentagem de captação do radiofármaco, mas não introduz diferenças no tempo que demora a captar o mesmo.

Para a linha celular HepG2, quando as células são cultivadas em meio HG, é possível observar uma diminuição com significado estatístico do parâmetro A nas células incubadas com quercetina (1,81%) quando comparadas às células controlo (2,96%) ($p < 0,01$). Essa diminuição também ocorre, e de uma forma mais evidente, quando as células são cultivadas em meio LG, embora não se verifiquem diferenças com significado estatístico, nestas condições, entre as células que foram tratadas com quercetina (0,76%) e as que não foram sujeitas ao fármaco (1,07%). Continuando com a comparação dos parâmetros A e T entre as diferentes condições de cultura celular, relativamente ao parâmetro A, verificaram-se também diferenças estatisticamente significativas entre as células controlo quando cultivadas em meio HG e em meio LG ($p = 0,001$), assim como entre as células tratadas com quercetina em meio HG e as células controlo em meio LG ($p < 0,05$) (figura 3.12. A).

No que diz respeito à linha celular HuH7, também se observa uma diminuição mais evidente da captação de ^{18}F -FDG nas células incubadas com quercetina comparativamente às células controlo quando as mesmas cresceram em meio LG, existindo diferenças com significado estatístico, para o parâmetro A, entre as células tratadas (1,04%) e as células controlo (1,86%) para esta formulação de meio ($p < 0,05$), como também em meio HG (3,49% e 16,19%, respetivamente) ($p < 0,01$) (figura 3.12. B).

Para a linha celular Hep3B2.1-7, em ambas as condições de meio, é notória a diminuição da captação do radiofármaco nas células tratadas com quercetina (1,40% em meio LG e 10,59% em meio HG) quando comparadas com as células controlo (3,42% em meio LG e 20,56% em meio HG). No entanto, não se verificam diferenças com significado estatístico quando comparamos os parâmetros A e T entre as diferentes condições de cultura celular (figura 3.12. C).

Relativamente à linha celular TFK-1, a diminuição verificada na percentagem de captação de ^{18}F -FDG nas células incubadas com quercetina em meio HG (1,86%) comparativamente às células sem este composto (9,41%) apresenta diferenças estatisticamente significativas no que respeita ao parâmetro A ($p < 0,001$). Também entre

as células controlo cultivadas em meio HG e as células tratadas com quercetina em meio LG (1,49%) existem diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$). De referir também a diminuição mais acentuada da percentagem de captação do radiofármaco entre as células que foram tratadas com quercetina e as que não foram sujeitas ao fármaco quando estas foram cultivadas em meio LG (3,37%), mas que não apresentaram diferenças estatísticas (figura 3.12. D).

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO

A incidência de tumores primários do fígado tem sofrido, nos últimos anos, aumentos bastante evidentes. O prognóstico é, na maioria das vezes, reservado o que torna este tipo de tumores um problema de importância global. Dentro destes, os mais frequentes são o carcinoma hepatocelular seguido do colangiocarcinoma [2]. O carcinoma hepatocelular é um dos tipos de cancro mais letais em todo o mundo, sendo atualmente a terceira causa de morte por cancro a nível mundial [3-5]. Não possui um tipo de tratamento específico, o prognóstico é muito pobre e a sobrevida diminuta [4, 7]. Embora o colangiocarcinoma seja o segundo tipo de cancro primário de fígado mais comum, apresenta uma elevada incidência nos países ocidentais, tendo, no entanto, opções terapêuticas limitadas [34]. Portanto, é neste sentido que se torna imperativo a procura de novos alvos terapêuticos, assim como novas moléculas com potencial curativo para este tipo de tumores.

Por outro lado, diversos estudos demonstraram que a expressão do transportador de glicose 1 se encontra aumentada no carcinoma hepatocelular, promovendo a tumorigénese, para além da elevada taxa glicolítica presente nas células tumorais [37-39]. Outros estudos indicaram ainda uma sobre-expressão deste transportador no colangiocarcinoma, embora não existam ainda evidências acerca do potencial tumorigénico do GLUT-1 neste tipo de tumor. É neste contexto que o GLUT-1 parece equacionado como novo alvo terapêutico para este tipos de tumores extremamente agressivos [40, 41].

Além disso, outros estudos demonstraram que os flavonoides e as isoflavonas são potentes inibidores de influxo da glicose, tendo sido demonstrado que os flavonóis (como a quercetina) inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP, sendo também capazes de inibir, competitivamente, o GLUT-1 através deste mecanismo [38, 59-61]. Deste modo, a quercetina, um flavonol bioativo ubiquamente presente em frutas e legumes, logo abundante na dieta humana, pode, também através deste mecanismo, ser considerada um potencial agente terapêutico para células de tumores primários do fígado, na medida em que se poderá verificar o seu efeito anticancerígeno como possível inibidor competitivo do GLUT-1, entre outras características.

Assim, tendo por base todas estas evidências, este trabalho experimental teve como principal objetivo avaliar o efeito anticancerígeno da quercetina em três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular que diferem entre si na expressão do gene supressor tumoral TP53 e numa linha celular humana de colangiocarcinoma.

A avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT permitiu obter as curvas dose-resposta para os tratamentos com quercetina em monoterapia e em combinação com o sorafenib, o fármaco mais utilizado na atualidade na terapia sistêmica de CHC, com o intuito de avaliar as diversas respostas celulares produzidas.

Verificou-se que a quercetina induz um efeito antiproliferativo quer nas linhas celulares de CHC, quer na linha celular de CC, uma vez que para todas as linhas celulares utilizadas e todos os tempos de incubação testados foi possível calcular o valor de IC₅₀, diminuindo este à medida que se aumenta o tempo de incubação com quercetina, o que significa que estamos perante uma resposta dependente da concentração de composto e do tempo de incubação. Este resultado vai de encontro a vários estudos encontrados na literatura, em vários tipos de cancro, incluindo CHC e CC, onde já havia sido demonstrado o efeito antiproliferativo da quercetina [83-87].

Observando os valores de IC₅₀ obtidos, percebe-se que a linha celular HepG2, nos tempos mais curtos, é a linha celular mais sensível à quercetina, apresentando os valores de IC₅₀ mais baixos para os dois primeiros tempos de incubação. Isto pode estar relacionado com o facto desta linha celular expressar a p53 normal, o que permite um melhor reconhecimento do dano induzido pelo fármaco no ADN [88]. Por outro lado e tendo em conta que a quercetina tem a capacidade de inibir ou de diminuir a expressão da glicoproteína-P [52] e que estudos prévios realizados no nosso laboratório mostraram que, de entre as linhas celulares de CHC em estudo, a linha HepG2 é aquela que mais expressa esta proteína [89], poderá estar a ocorrer um bloqueio e/ou inativação da glicoproteína-P, o que induz uma maior concentração de quercetina no interior da célula levando a que esta possua, portanto, uma maior sensibilidade a este composto.

A linha celular HuH7 é aquela que se mostra mais resistente à quercetina, uma vez que são necessárias concentrações superiores deste composto para que a proliferação celular seja inibida em 50%. Esta linha celular possui uma mutação no gene TP53 que induz uma sobre-expressão de uma proteína p53 mutada. No entanto, em vez dessa sobre-expressão conduzir uma maior capacidade da célula em reconhecer os danos induzidos pela quercetina e desta forma induzir o processo de morte [85], este composto, além de outras atividades biológicas, tem a capacidade de inibir a expressão da p53 mutada [55] e, conseqüentemente, induzir resistência.

Para tempos mais longos, os valores mais baixos de IC₅₀ pertencem à linha celular Hep3B2.1-7. Esta linha celular não expressa a proteína p53 [68, 69], o que lhe confere resistência e um fenótipo mais agressivo. Neste sentido, este resultado torna-se

bastante promissor na medida em que poderemos estar a reverter a resistência intrínseca que esta linha celular possui. Os resultados auspiciosos obtidos com esta linha celular podem estar relacionados com o facto de a quercetina ser capaz de induzir e estabilizar a expressão da p53, o que irá conferir a esta linha celular a capacidade de reconhecer danos no ADN, induzindo a morte celular ou bloqueios no ciclo celular [90]. No entanto, são necessários mais estudos de forma a explorar e identificar o papel da p53 nas diferentes respostas à quercetina pelas três linhas celulares de CHC utilizadas.

No que diz respeito à linha celular TFK-1, também se observa uma resposta, à quercetina, dependente do tempo e da concentração. Como já foi referido anteriormente, esta é uma linha celular pertencente a um outro tipo de cancro primário de fígado, o colangiocarcinoma. Nesta linha, apenas foram realizados dois estudos com quercetina [87, 91], sendo que, apenas no estudo de 1999 se avaliou o efeito da quercetina na proliferação celular [87]. Os autores verificaram uma redução da proliferação celular dependente do tempo e da concentração de quercetina, dados que corroboram os resultados por nós obtidos [87].

A avaliação do efeito induzido pelo sorafenib ao nível da proliferação celular, permitiu verificar que este possui um efeito mais evidente que a quercetina na inibição da proliferação celular para todas as linhas celulares em estudo, e que este efeito também é dependente da concentração e do tempo de incubação.

Tanto para a linha celular HepG2 como para a linha HuH7, observa-se um decréscimo do valor de IC_{50} à medida que aumenta o tempo de incubação, observando-se, exceccionalmente na linha celular HuH7, a partir das 96 horas de avaliação um aumento do valor de IC_{50} . Este resultado pode estar relacionado com o facto de se estabelecer uma resistência por parte da célula, isto é, a célula poder estar a ganhar resistência ao fármaco a que é sujeita, não se verificando, no entanto, significado estatístico no que diz respeito ao aumento do valor de IC_{50} . De facto, existem outros estudos que indicam que a resposta ao sorafenib varia entre linhas celulares e também entre doentes com CHC, sendo que algumas poderão possuir já alguma resistência intrínseca, e outras vir a desenvolvê-la [92, 93].

Ainda dentro dos resultados obtidos com a linha celular HuH7, para além do aumento do valor de IC_{50} já mencionado, verifica-se que esta é a linha celular de CHC mais resistente ao sorafenib, uma vez que são necessárias concentrações superiores deste composto para que a proliferação celular seja inibida em 50%. Tal como no caso da quercetina, o facto desta linha celular ser menos sensível ao sorafenib poderá estar

relacionado com a mutação na p53 [94-96]. Têm sido propostos novos papéis e funções relevantes para a supressão e mutações do gene TP53, incluindo a regulação das redes de microRNAs, a modulação de células do estroma e a indução de senescência celular. Desta forma, cada vez mais se verificam avanços nesta área, avanços estes que se tornam extremamente úteis para a compreensão do valor preditivo da p53 mutada em cancros humanos e, desta forma, da consequente resposta à quimioterapia [97].

A linha celular Hep3B2.1-7 apresenta, igualmente, valores de IC₅₀ decrescentes à medida que o tempo de incubação aumenta. Da mesma forma que acontece na avaliação do efeito antiproliferativo exercido pela quercetina, esta é a linha celular que apresenta maior sensibilidade ao sorafenib. O facto de esta linha celular sub-expressar a proteína p53 torna, mais uma vez, este resultado bastante promissor.

O facto dos resultados obtidos pelas três linhas celulares de CHC em resposta ao sorafenib demonstrarem, embora com diferenças entre elas, que as mesmas são na generalidade sensíveis a este fármaco vem de encontro ao que se verifica na prática clínica, onde o sorafenib é, nos dias de hoje, a terapia sistémica mais utilizada e mais promissora no tratamento de CHC [15, 98].

Curiosamente, a linha celular TFK-1, foi a linha celular mais sensível ao fármaco em estudo, apresentando, para todos os tempos de incubação, valores de IC₅₀ inferiores aos obtidos com as linhas celulares de CHC. Este resultado torna-se bastante promissor, no sentido em que o sorafenib não é utilizado na prática clínica em CC, como acontece no caso do tratamento do CHC, indicando que este fármaco pode ser útil também na terapêutica desta neoplasia. Por outro lado, este resultado vem de encontro a outros estudos *in vitro* realizados em CC, onde se verificou também o efeito antiproliferativo deste fármaco neste tipo de cancro e, inclusivamente, a indução da morte celular por apoptose através da supressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 [99-102].

Por outro lado, a avaliação da combinação da quercetina com o sorafenib, utilizando o método de Chou-Talalay, indicou que existe sinergia no efeito produzido ao nível da proliferação celular, nas linhas celulares de CHC, quando os compostos foram adicionados em simultâneo. Quando houve tempo de espera entre a adição dos dois compostos não ocorreu efeito sinérgico, o que indica que não deverá haver tempo de espera entre a adição dos compostos. O facto de ocorrer sinergia no tratamento combinado de quercetina com o sorafenib é um resultado bastante auspicioso e que está em concordância com a literatura, que descreve a quercetina como um inibidor da

atividade de tirosinas cinases [51, 52], pois com o tratamento combinado houve uma diminuição da concentração necessária de sorafenib, um inibidor multiquinase, para inibir a proliferação celular em 50%. Por outro lado, a quercetina possui o potencial de inibir o EGFR, que é o principal responsável pela resistência que alguns CHC's apresentam ao sorafenib, conseguindo-se, desta forma, ao associar a quercetina, aumentar a sensibilidade da célula em relação ao sorafenib [93, 103, 104]. Estas são possíveis explicações para o efeito sinérgico encontrado, sendo porém necessários estudos adicionais para confirmar estas hipóteses.

Curiosamente, a linha celular HuH7, que é aquela que apresentou maior resistência a ambos os compostos em terapia isolada, apresenta maior sensibilidade ao tratamento combinado, já que, em todas as diferentes etapas de combinação, ocorreu um decréscimo acentuado do valor de IC_{50} do sorafenib relativamente à adição deste isoladamente. O facto de a quercetina se encontrar em menor concentração, pode permitir que esta não exerça a sua função de inibição da expressão proteína p53 mutada, como possivelmente acontece quando se utiliza a quercetina em monoterapia, tal como foi referido anteriormente, provavelmente porque este composto não se encontra em concentrações suficientes para ter esse efeito. Neste sentido, tornar-se-ia interessante e necessário recorrer-se a estudos de proteómica que permitiriam a quantificação da proteína, de forma a ser possível corroborar este facto. Por outro lado, como foi referido anteriormente, a quercetina é um inibidor do EGFR, cuja expressão confere resistência ao sorafenib, podendo a sinergia estar a atuar através desta via.

Relativamente às linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7, quando os compostos foram adicionados em simultâneo o valor de IC_{50} do sorafenib reduziu, tal como quando os dois compostos foram adicionados com um intervalo de duas horas. No entanto, não se observaram diferenças significativas quando se adiciona o sorafenib 24 horas após a exposição à quercetina. Isto vem de encontro ao referido anteriormente, onde se mencionou que não deverá existir tempo de espera entre as adições dos dois fármacos, uma vez que apenas existe sinergia quando a adição ocorre em simultâneo. De referir ainda que os resultados obtidos para estas linhas celulares são semelhantes, uma vez que ocorre uma redução de cerca de duas vezes do valor de IC_{50} do sorafenib quando adicionado em simultâneo com a quercetina, verificando-se também semelhança nos valores dos índices de combinação que foram 0,69 para a linha celular HepG2 e 0,70 para a linha celular HuH7.

Na linha celular TFK-1, curiosamente, quando a adição foi efetuada 2 e 24 horas após a exposição à quercetina, ocorreu um aumento do valor de IC_{50} do sorafenib. De facto, para além do aumento dos valores de IC_{50} verificado, não se verificou sinergia em nenhuma das condições testadas. Este resultado poderá estar relacionado com a menor sensibilidade que a linha celular TFK-1 apresenta perante a quercetina utilizada em monoterapia, em relação às linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7.

Assim, as linhas celulares de CHC possuem diferentes respostas ao tratamento combinado comparativamente à linha de CC, o que indica que a ação combinada da quercetina com o sorafenib varia de acordo com o tipo de cancro em estudo, podendo vir a ser uma opção terapêutica no caso do CHC.

Com o objetivo de reforçar e corroborar os resultados obtidos através do ensaio do MTT e também verificar qual o efeito da quercetina a longo prazo, realizaram-se ensaios clonogénicos. Verificou-se que o tratamento com diferentes concentrações de quercetina introduziu alterações significativas ao nível da capacidade de formação de colónias em todas as linhas celulares em estudo, o que vem de encontro à citotoxicidade causada pelo tratamento com quercetina avaliada pelo ensaio do MTT.

Nas linhas HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7, com apenas 5 μ M de quercetina, verificou-se uma redução significativa de 20-25% da capacidade de formação de colónias relativamente ao controlo verificando-se, de seguida, a ausência de formação de colónias quando se utilizou o valor de quercetina correspondente ao IC_{50} , bem como o valor superior. Tal resultado poderá indicar que a quercetina possui um efeito mais significativo a longo prazo com curtos períodos de incubação. Também em outros estudos realizados *in vitro* noutros tipos de cancro, se verificou que a quercetina possui um efeito antiproliferativo mais evidente para tempos mais longos [105, 106].

Para a linha celular TFK-1, o tratamento com a menor concentração de quercetina induziu também uma diminuição significativa (cerca de 20%) da capacidade de formação de colónias. Em relação com os restantes tratamentos podemos constatar que, com a concentração igual ao IC_{50} e com concentração superior a esta, se verifica uma perda significativa da capacidade de formação de colónias (superior a 80%), não se observando, no entanto, no caso desta linha celular, uma total ausência de formação de colónias como sucedeu com as linhas celulares de CHC. Isto vem de encontro ao verificado anteriormente pelo ensaio do MTT, onde também se observou uma maior resistência a este composto, por parte desta linha celular, comparativamente às linhas

celulares HepG2 e Hep3B2.1-7. No entanto, também para a linha TFK-1, o efeito antiproliferativo da quercetina é mais promissor a longo prazo.

Os estudos de citotoxicidade pelo ensaio MTT apenas permitem aferir acerca da capacidade proliferativa das células, fornecendo alguma informação acerca da função mitocondrial. No entanto, não permitem averiguar se ocorre morte celular. A avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo é possível devido à utilização de sondas específicas como AV-FITC e o IP.

Através desta análise, verificou-se que a linha celular HepG2 possui uma tendência para ativar a morte celular por apoptose, o que poderá estar relacionado com o facto de esta linha celular apresentar uma expressão normal da proteína p53, sendo que, deste modo, a célula tem a capacidade de reconhecer o dano celular e desencadear o processo apoptótico. Para além disso, este resultado está em concordância com a literatura, onde vários trabalhos, em diversos tipos de cancro, indicam que a quercetina induz a morte celular por apoptose [107-110]. Para todas as concentrações de quercetina testadas, a viabilidade celular permaneceu em cerca de 60%. Curiosamente, os ensaios do MTT para avaliação da citotoxicidade da quercetina resultaram num valor de IC_{50} de 37,67 μ M para esta linha celular. No entanto, como referido anteriormente, o ensaio do MTT permite-nos apenas avaliar a percentagem de proliferação celular. É possível postular a hipótese de que, apesar da utilização de 37,67 μ M de quercetina inibir a proliferação celular, não é suficiente para desencadear morte celular em 50%. Ou seja, as células poderão permanecer viáveis embora com uma reduzida atividade mitocondrial [110].

Em relação à linha celular HuH7, quando as células foram incubadas com quercetina, em especial com 5 μ M e com 90,60 μ M, a viabilidade celular manteve-se semelhante à verificada no controlo, observando-se que ao aumentar a dose do composto, existe uma tendência a ativar a morte celular por apoptose. De facto, como referido anteriormente, vários autores indicam que a quercetina pode retardar o crescimento de algumas células tumorais e pode ajudar a promover a apoptose [53, 54]. Por sua vez, para a maior concentração de quercetina utilizada, a viabilidade celular decresceu para cerca de 40% e, de entre as células que morrem, existe um balanço entre a necrose e a apoptose. Embora, em resposta à quercetina, a morte celular por apoptose seja mais frequente, a indução de morte celular por necrose por este composto também já foi verificada em outros estudos [111-113]. Portanto, este resultado poderá dever-se ao facto de se tratar da condição onde se utilizou uma maior concentração de quercetina,

o que poderá ter induzido efeitos mais agressivos nas células, levando a uma morte celular também esta mais agressiva.

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, verifica-se que quando as células foram incubadas com a concentração correspondente ao IC₅₀, cerca de 45% das células permaneceram viáveis, enquanto que 20% morreram por necrose e 35% por apoptose. Através deste resultado verifica-se que, nesta linha celular, existe uma relação mais direta entre a inibição da proliferação e a ativação dos mecanismos de morte celular. Aumentando a concentração do composto para 100 µM, existe apenas uma ligeira diminuição da percentagem das células viáveis em relação à condição anterior e a percentagem da população celular em apoptose inicial tende a igualar-se com a percentagem em necrose. No caso desta linha celular, o balanço entre a apoptose e a necrose poderá estar relacionado com o facto de existir um défice na expressão de p53, o que induz na célula uma maior dificuldade em ativar o mecanismo apoptótico, recorrendo, neste caso, as células a um tipo de morte alternativo à apoptose como a necrose. Torna-se importante realçar, mais uma vez, os resultados promissores obtidos com esta linha celular reforçados novamente pelo facto de esta linha apresentar um fenótipo mais agressivo.

Para a linha celular de colangiocarcinoma, é possível observar que não existe uma indução evidente da morte celular, pois mesmo incubando as células com 100 µM de quercetina, a viabilidade celular é de cerca de 65%, no entanto, consegue-se ainda verificar que quando ocorre morte esta é essencialmente por apoptose. Estes resultados corroboram os factos evidenciados anteriormente onde, por exemplo nos ensaios clonogénicos e nas terapias combinadas, se obtiveram resultados menos promissores com a quercetina isoladamente nesta linha celular comparativamente às linhas celulares de CHC.

Vários autores indicam que a apoptose mediada por quercetina pode resultar da indução de stresse proteico, da rutura de microtúbulos e mitocôndrias, da libertação do citocromo c e ativação de caspases [47, 110]. Neste sentido, investigou-se a via mitocondrial da apoptose analisando a expressão das proteínas Bax e Bcl-2.

Relativamente à ativação das vias pró- e antiapoptóticas em resposta à quercetina, podemos verificar que, relativamente ao controlo, o tratamento com quercetina tende a aumentar a razão Bax/Bcl-2 em todas as linhas celulares em estudo, exceto na linha celular HuH7, sendo este aumento, curiosamente, mais evidente na linha celular TFK-1, o que significa que a proteína pró-apoptótica é mais expressa do que a

proteína antiapoptótica. Estes resultados vêm corroborar os resultados obtidos pela análise da AV-FITC/IP, onde a morte por apoptose induzida por quercetina está presente em todas as linhas celulares em estudo. Para além disso, os nossos resultados estão de acordo com a literatura onde vários estudos revelaram que a quercetina permitiu o aumento da expressão de Bax, com uma diminuição concomitante dos níveis de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, sugerindo que este composto induz a apoptose através da via mitocondrial [57, 114-116].

Uma vez que para a condição controlo, tanto para a linha celular HepG2 como para a linha celular Hep3B2.1-7, se verifica uma razão Bax/Bcl-2 inferior a 1, o que indica que estas linhas sobre-expressam a proteína Bcl-2 relativamente à proteína Bax, leva-nos a crer que este facto possa estar relacionado com a resistência multifármacos intrínseca que o CHC apresenta [15, 25-30].

Para a linha HepG2, quando as células são incubadas com a concentração correspondente ao IC_{50} e com a concentração superior a este, observa-se o aumento da razão Bax/Bcl-2, o que vem de encontro aos resultados obtidos pela análise da AV-FITC/IP, onde a morte celular, quando ocorre, acontece por apoptose.

Já para a linha celular HuH7, apenas se verifica este aumento da razão Bax/Bcl-2 para a concentração inferior à concentração correspondente ao IC_{50} . Como referido anteriormente, em resposta ao tratamento com quercetina, nesta linha celular, ocorreu morte por apoptose, o que está de acordo com a relação Bax/Bcl-2, quando as células são incubadas com 5 μ M. Embora haja pouca evidência do envolvimento da Bax e da Bcl-2 no desencadear da apoptose, nesta linha celular, a apoptose de facto acontece, podendo estar a ser mediada por outras proteínas pertencentes à mesma família, como a Mcl-1, Bad ou Bcl-xl, tal como aconteceu em outros estudos realizados com quercetina em diferentes linhas celulares cancerígenas [117-119].

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, é possível observar um aumento gradual da razão Bax/Bcl-2 à medida que se utilizam concentrações crescentes de quercetina, o que, mais uma vez, está de acordo com os resultados obtidos pela análise da AV-FITC/IP, onde para além de nesta linha celular se verificar um tipo de morte por apoptose, é a linha onde se verifica a maior percentagem de morte celular.

Para a linha celular TFK-1, é evidente o aumento da razão Bax/Bcl-2 verificado nas células sujeitas a tratamento com quercetina relativamente ao controlo. Na condição controlo, é possível verificar que a razão Bax/Bcl-2 é aproximadamente 1, o que significa que existe um balanço entre as duas proteínas, e quando se expõem as células à

quercetina observa-se o referido aumento da razão. Estes resultados parecem ser consistentes com os resultados obtidos através da dupla marcação com AV/IP, onde embora a morte celular seja reduzida quando ocorre é essencialmente por apoptose, sendo então acompanhada por um aumento da razão Bax/Bcl-2 para valores superiores a 1, sugerindo que a via pró-apoptótica poderá estar ativada.

A citometria de fluxo, com recurso ao iodeto de propídeo, permite avaliar a influência do tratamento com quercetina na progressão do ciclo celular.

Pela análise do ciclo celular pode-se constatar que, nas linhas celulares HepG2 e HuH7, ocorre o aparecimento e aumento do pico pré-apoptótico à medida que se aumenta a concentração de quercetina. Estes resultados são concordantes com a avaliação do tipo de morte celular, que ocorreu essencialmente por apoptose, assim como o aumento da razão Bax/Bcl-2. As células em fase pré-G1 correspondem a células com baixo conteúdo de ADN. Assim, essa população pode ser caracterizada como células cujo conteúdo de ADN está diminuído devido à fragmentação deste, uma das características iniciais da apoptose [120]. De referir também que existe um ligeiro aumento com diferenças significativas da população celular em fase G0/G1 quando as células são incubadas com a concentração correspondente ao IC₅₀, bem como entre esta condição e a maior concentração de quercetina utilizada, o que sugere um bloqueio nesta fase do ciclo celular. O bloqueio nesta fase já havia sido observado noutras linhas celulares cancerígenas em resposta ao tratamento com quercetina [121, 122]. Observa-se também uma diminuição da população em fase S à medida que se aumenta a concentração de quercetina, resultado este que é corroborado pelos resultados obtidos pelo ensaio do MTT, onde com 100 µM de quercetina se verificou uma acentuada diminuição da proliferação celular. Provavelmente, este bloqueio na fase G0/G1 e a diminuição na fase S justificam o facto de a morte celular não ser significativa, mas também o facto de o ensaio do MTT apresentar valores bastante evidentes. Ou seja, as células não morrem mas, no entanto, permanecem na fase G0/G1, sem proliferarem uma vez que a síntese diminui. Para as células sujeitas a tratamento com a concentração superior ao IC₅₀, a diminuição da população em fase S é acompanhada de um pequeno aumento da população em fase G2/M. De referir que na literatura existem evidências de que o tratamento com quercetina provoca paragens no ciclo celular, nomeadamente ao nível da fase G2/M [47, 109].

Em relação à linha celular Hep3B2.1-7, embora não haja significado estatístico, existe uma tendência para um pequeno aumento gradual da população em fase pré-G1 à

medida que se utilizam as concentrações crescentes de quercetina, observando-se também uma ligeira diminuição da população em fase S para a maior concentração de quercetina utilizada, em relação às outras condições.

Para a linha celular TFK-1, não se verificam diferenças significativas na população em fase pré-G1, o que está de acordo com o facto de não se verificar morte celular evidente obtida pela análise da AV-FITC/IP. No entanto, observa-se a diminuição da população em fase S nas células incubadas com as concentrações superiores ao valor de IC₅₀, o que corrobora os resultados obtidos pelo teste do MTT onde ocorreu uma diminuição da proliferação celular. De referir também o aumento gradual da população em fase G2/M à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada relativamente ao controlo, facto este que vem de acordo, mais uma vez, com a literatura que afirma que o tratamento com quercetina induz paragem nesta fase do ciclo celular.

A quercetina é caracterizada como um composto anti-/pró-oxidante. Alguns estudos salientam o seu efeito pró-oxidante [109, 123], enquanto que outros lhe atribuem capacidades antioxidantes [52, 110]. Neste sentido, torna-se importante avaliar a produção de ROS e a influência das defesas antioxidantes responsáveis pela sua inativação.

A marcação com a sonda DCF, referente à percentagem da produção de peróxidos pelas quatro linhas em estudo, revelou que o tratamento com quercetina introduz alterações ao nível da produção intracelular de peróxidos. Nas linhas celulares HepG2, HuH7 e Hep3B2.1-7, a produção de peróxidos aumenta gradualmente até ao valor da concentração correspondente ao IC₅₀, diminuindo de seguida para a maior concentração de quercetina utilizada. O aumento da produção de peróxidos, nomeadamente do peróxido de hidrogénio, verificado nas células de CHC tratadas com quercetina vem reforçar as suas características pró-oxidantes [123]. No entanto, verifica-se uma diminuição destas espécies para a maior concentração de quercetina. Portanto, isto leva a crer que para doses mais elevadas a quercetina pode ter efeito antioxidante [52, 123]. Por outro lado, a diminuição da produção de peróxidos com maiores concentrações de quercetina pode também ser explicada através da possibilidade de estas espécies terem sido convertidas em espécies mais lesivas para a célula como o radical hidroxilo (OH[•]) e/ou peróxido nitrito (ONOO⁻). Na presença de ferro livre, o peróxido de hidrogénio é transformado pela reação 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 reativos e tóxicos para a célula podendo induzir morte celular [124, 125], surgindo aqui o interesse sobre o estudo das mesmas. No caso da linha celular TFK-1, parece que não há efeito ao nível da produção intracelular de peróxidos.

A análise da fluorescência da sonda DHE permitiu verificar uma tendência para o aumento da produção do anião superóxido em resposta à quase totalidade dos tratamentos com quercetina utilizados, sendo a linha celular HepG2 a única exceção a estes resultados. Nesta linha celular observa-se uma diminuição da produção intracelular de anião superóxido relativamente ao controlo, diminuição esta que se mantém praticamente constante à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada, e que poderá estar relacionada com o efeito antioxidante da quercetina [52].

Curiosamente, a produção do anião superóxido diminui quando a linha celular HepG2 é incubada com a menor concentração de quercetina utilizada e aumenta na linha celular TFK-1 para esta condição. Nas restantes linhas, o aumento da produção do anião superóxido referido anteriormente é mais evidente para a maior concentração de quercetina utilizada.

A expressão da GSH em resposta ao tratamento com quercetina tem tendência a estar aumentada, quando comparada com o controlo, isto para todas as linhas celulares em estudo. A enzima GSH é responsável pela inativação da reação de dismutação que dá origem ao peróxido de hidrogénio [82]. Portanto, o aumento da concentração de GSH livre pode ser indicativo de, nestas condições, a concentração de peróxido de hidrogénio estar diminuída, uma vez que este é substrato da GSH.

Na linha HepG2, apenas se verifica um aumento da expressão da GSH para a maior concentração de quercetina utilizada, observando-se uma ligeira diminuição desta nas condições anteriores. Já nas linhas celulares HuH7 e TFK-1, é possível observar um aumento da expressão de GSH até ao valor da concentração correspondente ao IC₅₀, seguindo-se uma diminuição desta para a concentração mais elevada de quercetina utilizada, sendo estes resultados mais evidentes para a linha HuH7. De facto, o aumento da produção de peróxidos leva a que a célula produza GSH na tentativa de neutralizar estas espécies. Por sua vez, como ocorre uma diminuição da produção de peróxidos para a maior concentração de quercetina utilizada, a célula já não tem necessidade de produzir uma quantidade de GSH tão elevada. Para a linha Hep3B2.1-7, o aumento da expressão da GSH verifica-se logo para a menor concentração de quercetina utilizada, mantendo-se constante para os restantes tratamentos. O aumento da produção de GSH

livre em resposta ao tratamento com quercetina acompanha o também aumento de peróxidos nesta linha celular e pode ser subentendido como uma tentativa da célula em neutralizar os peróxidos.

Em relação à expressão do GLUT-1, verifica-se que nas linhas HepG2 e HuH7, ocorre um aumento da expressão membranar deste transportador acompanhado por uma diminuição da expressão citoplasmática do mesmo à medida que se aumenta a concentração de quercetina utilizada, sendo estes resultados mais evidentes na linha celular HuH7. De facto, alguns estudos demonstraram que os flavonoides e as isoflavonas são potentes inibidores de influxo da glicose, tendo sido demonstrado que os flavonóis (como a quercetina) inibem as tirosinas cinases da ligação de ATP, sendo também capazes de inibir, competitivamente, o GLUT-1 através deste mecanismo [38, 59-61]. Neste sentido, a quercetina ao inibir competitivamente o GLUT-1 ao nível membranar, poderá fazer com que as células tumorais recrutem mais transportadores deste tipo para a membrana de forma a suprir as necessidades glicolíticas, levando ao respetivo aumento da expressão membranar do GLUT-1 com conseqüente diminuição da expressão citoplasmática do mesmo.

Para as linhas celulares Hep3B2.1-7 e TFK-1, à medida que se aumenta a concentração de quercetina, também se verifica um aumento da expressão membranar do GLUT-1 relativamente ao controlo, com maior evidência na linha Hep3B2.1-7, não apresentando, no entanto, uma diminuição significativa da expressão citoplasmática.

Os estudos de captação de ^{18}F -FDG permitiram verificar, na generalidade, que existe uma maior percentagem de captação do radiofármaco quando as células são cultivadas em meio *low glucose*. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos na prática clínica, que demonstram que os valores de glicemia afetam o valor do diagnóstico da PET com recurso ao ^{18}F -FDG [126]. Os resultados obtidos corroboram ainda outros resultados *in vitro* adquiridos no nosso laboratório, onde se verificou que o teor de glicose no meio influencia a captação do referido radiofármaco [45].

Por outro lado, verifica-se também que em todas as linhas celulares em estudo existe uma diminuição da percentagem de captação de ^{18}F -FDG nas células incubadas previamente com quercetina quando comparadas com as células controlo, tal como se pode verificar pelos maiores valores do parâmetro A (captação máxima) atribuídos às células sem quercetina. Esta diminuição da captação pode estar relacionada com o facto de a quercetina inibir competitivamente o GLUT-1 [38, 59-61] e com o facto deste transportador, assim como do GLUT-3, serem as principais vias de entrada deste

radiofármaco na célula [42]. Tais evidências poderão constituir um motivo para a diminuição da captação do radiofármaco verificada nas células incubadas previamente com quercetina. Por outro lado, o ^{18}F -FDG é um análogo radiomarcado da glicose [42], o que, por analogia, poderá permitir postular que a quercetina compromete a captação de glicose, tal como já foi demonstrado em outros estudos [48, 127].

Diversos estudos têm demonstrado também que a captação de ^{18}F -FDG se encontra relacionada com a expressão da proteína p53 em diversas linhas celulares de CHC [38, 44]. Por outro lado, em células em cultura, verificou-se uma maior captação do análogo radioativo da glicose em células que sub-expressam a p53 relativamente a células que expressam esta proteína, as quais apresentaram uma baixa captação de ^{18}F -FDG [44, 45]. Em resumo, diferentes tumores possuem diferentes níveis de captação de ^{18}F -FDG, o que poderá estar intimamente correlacionado com as diferenças existentes na expressão de GLUT's de cada tumor e com o perfil genético dos mesmos [38].

Tal como já foi referido anteriormente, existe uma diminuição da captação de ^{18}F -FDG quando as células foram incubadas com quercetina, embora esta não seja acompanhada por uma inibição da expressão membranar do GLUT-1, o que indica que, de facto, tal como já está descrito na literatura, a quercetina é um inibidor competitivo do GLUT-1, uma vez que consegue diminuir a sua função mas não a sua expressão [59-61].

Para a linha celular HepG2, embora seja mais evidente a diminuição da percentagem de captação do radiofármaco quando as células são cultivadas em meio LG, tal como se observa na linha celular HuH7, não se verificam diferenças com significado estatístico, nestas condições, entre as células que foram tratadas com quercetina e as que não foram sujeitas ao fármaco.

Para a linha celular Hep3B2.1-7, em ambas as condições de meio, é notória a diminuição da captação do radiofármaco nas células tratadas com quercetina quando comparadas com as células controlo, embora para o meio LG as percentagens de captação sejam maiores, tal como já foi referido. Este facto indica que existe uma maior competição por parte do GLUT-1, sendo que, curiosamente, esta é a linha celular que apresenta resultados mais expressivos ao nível da ativação da morte celular, bem como ao nível da inibição da proliferação celular a tempos mais longos, o que indica que, de facto, poderá ser também através da via da inibição competitiva do GLUT-1 que a quercetina atua nestas células.

Relativamente à linha celular TFK-1, também se verifica uma diminuição na percentagem de captação de ^{18}F -FDG nas células incubadas com quercetina em meio HG comparativamente às células sem este composto. Tal como se verificou para as linhas celulares de CHC, a diminuição da percentagem de captação do radiofármaco foi mais notória em meio LG. Neste sentido, torna-se importante salientar que não existem ainda estudos acerca do potencial tumorigénico do GLUT-1 neste tipo de tumor e, portanto, surge aqui um resultado deveras inovador e promissor.

Em suma, os resultados descritos anteriormente parecem indicar que está a ocorrer inibição competitiva por parte da quercetina, tal como se encontra descrito na literatura para outras linhas celulares, e que este mecanismo poderá estar relacionado com o efeito antiproliferativo observado tanto nas linhas celulares de CHC como na linha de CC.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Durante este trabalho experimental, cujo objetivo principal foi avaliar o efeito anticancerígeno da quercetina em três linhas celulares de CHC e numa linha celular de CC, e tendo em conta os resultados obtidos, foi possível retirar as seguintes conclusões:

- Os estudos de proliferação permitiram concluir que a quercetina, assim como o sorafenib, possuem um efeito antiproliferativo em todas as linhas celulares estudadas, e que este efeito é dependente da concentração do composto utilizada e do tempo de incubação.
- A combinação da quercetina com o sorafenib é mais eficaz para as linhas celulares de CHC, onde se verifica sinergia aquando da adição simultânea dos dois compostos. No entanto, não ocorreu sinergia quando houve tempo de espera entre a adição dos dois compostos, indicando que a terapia combinada deve ser realizada em simultâneo.
- O ensaio clonogénico permitiu verificar que a quercetina possui a capacidade de diminuir a formação de colónias em todas as linhas celulares em estudo.
- A análise da viabilidade celular permitiu concluir que o tratamento com quercetina diminui a viabilidade em todas as linhas celulares utilizadas e que a principal via de morte induzida pelo tratamento é a apoptose.
- A análise da relação entre a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 permitiu verificar que o tratamento com quercetina tende a induzir um aumento da razão Bax/Bcl-2 em, praticamente, todas as linhas celulares em estudo, significando que existe uma maior expressão da proteína pró-apoptótica em relação à antiapoptótica.
- A análise do ciclo celular permitiu concluir que, para todas as linhas celulares em estudo, em resposta à quercetina, ocorre uma paragem do ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, verificando-se ainda uma diminuição da população em fase S e, apenas para as linhas celulares de CHC, um aumento da população em fase pré-G1.
- A análise da produção de ROS e da expressão de defesas antioxidantes permitiu concluir que o peróxido de hidrogénio é a ROS com o papel mais evidente na toxicidade induzida pela quercetina.
- A avaliação da expressão de GLUT-1 permitiu verificar um aumento da expressão membranar deste transportador, acompanhado de uma diminuição citoplasmática do mesmo, em resposta à incubação com quercetina.

- Os estudos de captação do radiofármaco ^{18}F -FDG permitiram verificar que existe uma maior percentagem de captação do radiofármaco quando as células são cultivadas em meio *low glucose*. Por outro lado, foi possível verificar também que em todas as linhas celulares em estudo existe uma diminuição da percentagem de captação de ^{18}F -FDG nas células incubadas previamente com quercetina quando comparadas com as células que não foram sujeitas ao fármaco. No geral, os estudos indicam que através do bloqueio competitivo do GLUT-1 e consequente diminuição do influxo de glicose, poderá estar a ser desencadeado um efeito antiproliferativo e, por vezes, de morte celular, predominando a apoptose.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Goodman ZD (2007) Neoplasms of the liver. *Modern Pathology* **20**: p. 49-60.
- [2] Yu MC, Yuan Jian-Min (2004) Environmental Factors and Risk for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **127**: p. 72-78.
- [3] Venook AP *et al* (2010) The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* **15**: p. 5-13.
- [4] Yang JD, Roberts LR (2010) Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **7**: p. 448-58.
- [5] Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P (2009) Hepatocellular carcinoma: epidemiological trends and risk factors. *Digestive Diseases* **27**: p. 80-92.
- [6] El-Serag HB (2012) Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **142**: p. 1264-1273.
- [7] El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**: p. 2557-2576.
- [8] Neuveut C, Wei Y, Buendia MA (2010) Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology* **52**: p. 594-604.
- [9] Brechot C *et al* (2010) Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathologie Biologie* **58**: p. 278-87.
- [10] Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA (2010) Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* **16**: p. 3603-15.
- [11] Thorgeirsson, SS, Grisham, JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* **31**: p. 339-346.

- [12] Alves RCP *et al* (2011) Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology* **10**: p. 21-7.
- [13] Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G (1999) P53 and Chemosensitivity. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* **10**: p. 1011-21.
- [14] Chen GG *et al* (2003) Mutation of p53 in Recurrent Hepatocellular Carcinoma and Its Association with the Expression of ZBP-89. *American Journal of Pathology* **162**: p. 1823-29.
- [15] Skelton M, O'Neil B (2011) Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **140**: p. 1410-26.
- [16] Wörns MA *et al* (2009) Systemic Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases* **27**: p. 175-188.
- [17] Bruix J, Sherman M (2005) Management of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **42**: p. 1208-36.
- [18] Wörns MA, Galle PR (2010) Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Diseases* **42**: p. 302-9.
- [19] Bruix J *et al* (2004) Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **5**: p. 215-219.
- [20] Llovet JM (2005) Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology* **40**: p. 225-35.
- [21] Ruff P (2004) Therapeutic Options in Hepatocellular Carcinoma. *American Journal of Cancer* **3**: p. 119-131(13).

- [22] Cheung TT *et al* (2010) Combined resection and radiofrequency ablation for multifocal hepatocellular carcinoma: prognosis and outcomes. *World Journal of Gastroenterology* **16**: p. 3056-62.
- [23] Raoul Jean-Luc (2008) Natural History of Hepatocellular Carcinoma and Current Treatment Options. *Elsevier Inc. - Seminars in Nuclear Medicine* **38**: p. 13-18.
- [24] Bruix J, Llovet JM (2002) Prognostic Prediction and Treatment Strategy in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **35**: p. 519-524.
- [25] Johnson PJ (2000) Systemic chemotherapy of liver tumors. *Seminars in Surgical Oncology* **19**: p. 116-24.
- [26] Giglia JL *et al* (2010) Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future. *Cancer Control* **17**: p. 120-9.
- [27] Forbes A, Williams R (1987) Chemotherapy and radiotherapy of malignant hepatic tumours. *Baillieres Clinical Gastroenterology* **1**: p. 151-69.
- [28] Yeo W *et al* (2005) A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **97**: p. 1532-8.
- [29] Fabregat I (2009) Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology* **15**: p. 513-20.
- [30] Hussain SP *et al* (2007) TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* **26**: p. 2166-76.
- [31] Ma S *et al* (2010) Approach to radiation therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treatment Reviews* **36**: p. 157-63.

- [32] Cao Y *et al* (2009) Human augments liver regeneration is important for hepatoma cell viability and resistance to radiation-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **47**: p. 1057-66.
- [33] Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M (2009) Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World Journal of Gastroenterology* **15**: p. 4240-4262.
- [34] Blechacz B, Gores GJ (2008) Cholangiocarcinoma: Advances in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Hepatology* **48**: S1.
- [35] Anderson CD *et al* (2004) Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *The Oncologist* **9**: p. 43-57.
- [36] Goodman ZD (2007) Neoplasms of the liver. *Modern Pathology* **20**: p. 49-60.
- [37] Amann T *et al* (2009) GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American Journal of Pathology* **174**: p. 1544-52.
- [38] Amann T, Hellerbrand C (2009) GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **13**: p. 1411-27.
- [39] Evans A *et al* (2008) Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **61**: p. 377-93.
- [40] Roh MS *et al* (2004) Diagnostic utility of GLUT1 in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Hepatogastroenterology* **51**: p. 1315-8.
- [41] Zimmerman RL *et al* (2002) Assessment of Glut-1 expression in cholangiocarcinoma, benign biliary lesions and hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* **9**: p. 689-92.

- [42] Jadvar H, Alavi A, Gambhir SS (2009) 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *The Journal of Nuclear Medicine* **50**: p. 1820-7.
- [43] Haubner R (2010) PET radiopharmaceuticals in radiation treatment planning – Synthesis and biological characteristics. *Radiotherapy and Oncology* **96**: p. 280-287.
- [44] Smith TA (2010) Influence of chemoresistance and p53 status on fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation in cancer. *Nuclear Medicine and Biology* **37**: p. 51-5.
- [45] Brito AF *et al* (2011) Glut1 Expression in Hepatocellular Carcinoma: Correlation with 18F-FDG Uptake. *Journal of Hepatology* **54**: S1.
- [46] Seufi AM *et al* (2009) Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **28**: 80.
- [47] Nomura M *et al* (2008) Inhibitory Mechanisms of Flavonoids on Insulin-Stimulated Glucose Uptake in MC3T3-G2/PA6 Adipose Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**: p. 1403-1409.
- [48] Park JB (1999) Flavonoids Are Potential Inhibitors of Glucose Uptake in U937 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **260**: p. 568-574.
- [49] Adebamowo CA *et al* (2005) Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. *International Journal of Cancer* **114**: p. 628-633.
- [50] Martin Hans-Jorg, Kornmann F, Fuhrmann GF (2003) The inhibitory effects of flavonoids and antistrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. *Chemico-Biological Interactions* **146**: p. 225-235.
- [51] Akiyama T *et al* (1987) Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: p. 5592-5595.

- [52] Chen C, Zhou J, Ji C (2010) Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences* **87**: p. 333-338.
- [53] <http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/ComplementaryandAlternativeMedicine/DietandNutrition/quercetin>. Acedido a 13 de novembro de 2012 às 14h08m.
- [54] Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**: p. 495-516.
- [55] Kim Young-Ho *et al* (2008) Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochemical Pharmacology* **75**: p. 1946-1958.
- [56] Nothlings U *et al* (2007) Flavonols and Pancreatic Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology* **166**: p. 924-931.
- [57] Volate SR *et al* (2005) Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis* **26**: p. 1450-1456.
- [58] Van Z *et al* (2007) The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochemical Pharmacology* **74**: p. 345-351.
- [59] Furuta E *et al* (2010) Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* **1805**: p. 141-52.
- [60] Vera JC *et al* (2001) Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* **40**: p. 777-90.
- [61] Vargas AJ *et al* (2011) Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integrative Cancer Therapies* **10**: p. 328-40.

- [62] Wang G *et al* (2012) Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *PLoS ONE* **7**: e51764.
- [63] Chan ST *et al* (2013) Quercetin enhances the antitumor activity of trichostatin A through upregulation of p53 protein expression in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **8**: e54255.
- [64] Sung JY *et al* (2010) Expression of the GLUT1 glucose transporter and p53 in carcinomas of the pancreatobiliary tract. *Pathology – Research and Practice* **206**: p. 24-9.
- [65] Zimmerman RL *et al* (2002) Assessment of Glut-1 expression in cholangiocarcinoma, benign biliary lesions and hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* **9**: p. 689-92.
- [66] Roh MS *et al* (2004) Diagnostic utility of GLUT1 in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Hepatogastroenterology* **51**: p. 1315-8.
- [67] Paudyal B *et al* (2008) Expression of glucose transporters and hexokinase II in cholangiocellular carcinoma compared using [18F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *Cancer Science* **99**: p. 260-6.
- [68] Kaino M (1997) Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *Journal of Gastroenterology* **32**: p. 40-46.
- [69] Seewoo V *et al* (2012) The different induction mechanisms of growth arrest DNA damage inducible gene 45 in human hepatoma cell lines. *Chemotherapy* **58**: p. 165-174.
- [70] Datki Z *et al* (2003) Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin* **62**: p. 223-229.

- [71] Cardoso SM *et al* (2001) Functional mitochondria are required for amyloid β -mediated neurotoxicity. *The FASEB Journal* **8**: p. 1439-1441.
- [72] Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances Enzyme Regulation* **22**: p. 27-55.
- [73] Davey HM, Kell DB (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses; Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiology Reviews* **60**: p. 641-96.
- [74] Haywood-Small SL *et al* (2006) Phthalocyanin-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339**: p. 569-76.
- [75] Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology* **39**: p. 615-47.
- [76] Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: p. 770-6.
- [77] Heiden VMG, Thompson CB (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology* **1**: p. 209-16.
- [78] Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1644**: p. 83-94.
- [79] Murphy KM *et al* (2000) Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation* **7**: p. 102-11.
- [80] Linke SP *et al* (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & Development* **10**: p. 934-947.

- [81] Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**: p. 717-27.
- [82] Hedley DW, Chow S (1994) Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**: p. 349-58.
- [83] Chang YF *et al* (2009) Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-methoxyestradiol in human hepatoma cells. *Nutrition and Cancer* **61**: p. 735-45.
- [84] Shi M *et al* (2003) Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology* **9**: p. 73-78.
- [85] Angst E *et al* (2013) The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Pancreas* **42**: p. 223-9.
- [86] Berndt K *et al* (2013) Evaluation of quercetin as a potential drug in osteosarcoma treatment. *Anticancer Research* **33**: p. 1297-306.
- [87] Mitsuhiro K *et al* (1999) Effects of Quercetin and Sunphenon on Responses of Cancer Cells to Heat Shock Damage. *Experimental and Molecular Pathology* **66**: p. 66-75.
- [88] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: p. 55-63.
- [89] Mendes M *et al* (2012) ^{18}F -FDG versus $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI in study of multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. *EJNMMI*: PW005.

- [90] Vargas AJ *et al* (2011) Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integrative Cancer Therapies* **10**: p. 328-40.
- [91] Kukongviriyapan V *et al* (2006) Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica* **36**: p. 15-28.
- [92] Abou-Alfa GK (2009) Selection of patients with hepatocellular carcinoma for sorafenib. *Journal of the Naional Comprehensive Cancer Network* **7**: p. 397-403.
- [93] Ezzoukhry Z *et al* (2012) EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *International Journal of Cancer* **131**: p. 2961-9.
- [94] Zauli G *et al* (2012) The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status. *Haematologica* **97**: p. 1722-30.
- [95] Arnault JP *et al* (2012) Skin tumors induced by sorafenib; paradoxical RAS-RAF pathway activation and oncogenic mutations of HRAS, TP53, and TGFBR1. *Clinical Cancer Research* **18**: p. 263-72.
- [96] Roy CS *et al* (2010) Synergistic efficacy of sorafenib and genistein in growth inhibition by down regulating angiogenic and survival factors and increasing apoptosis through upregulation of p53 and p21 in malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification or non-amplification. *Investigational New Drugs* **28**: p. 812-24.
- [97] Goldstein I *et al* (2011) Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Therapy* **18**: p. 2-11.
- [98] Llovet JM *et al* (2008) Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine* **359**: p. 378-90.

- [99] Huether A *et al* (2007) Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochemical Pharmacology* **73**: p. 1308-1317.
- [100] Kim do H *et al* (2013) Preclinical evaluation of sorafenib-eluting stent for suppression of human cholangiocarcinoma cells. *International Journal of Nanomedicine* **8**: p. 1697-711.
- [101] Sugiyama H *et al* (2011) Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Journal of Gastroenterology* **46**: p. 779-89.
- [102] Huether A *et al* (2007) Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochemical Pharmacology* **73**: p. 1308-17.
- [103] Jung JH *et al* (2010) Quercetin suppresses HeLa cell viability via AMPK-induced HSP70 and EGFR down-regulation. *Journal of Cellular Physiology* **223**: p. 408-14.
- [104] Kim H *et al* (2011) EGFR inhibitors enhanced the susceptibility to NK cell-mediated lysis of lung cancer cells. *Journal of Immunotherapy* **34**: p. 372-81.
- [105] Yeh YA *et al* (1995) Quercetin: synergistic action with carboxyamidotriazole in human breast carcinoma cells. *Life Sciences* **13**: p. 1285-1292.
- [106] Shen F, Weber G (1997) Synergistic action of quercetin and genistein in human ovarian carcinoma cells. *Oncology Research* **9**: p. 597-602.
- [107] Jakubowicz-Gil J *et al* (2013) Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumour Biology*.
- [108] Lee KH, Yoo CG (2013) Simultaneous Inactivation of GSK-3 β Suppresses Quercetin-Induced Apoptosis by Inhibiting JNK Pathway. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*.

- [109] Bishayee K *et al* (2013) Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Proliferation* **46**: p. 153-63.
- [110] Zhang JY *et al* (2013) Quercetin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in KB and KBv200 Cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **61**: p. 2188-2195.
- [111] Wang G *et al* (2012) Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. *International Journal of Nanomedicine* **7**: p. 271-280.
- [112] Granado-Serrano AB *et al* (2012) Quercetin attenuates TNF-induced inflammation in hepatic cells by inhibiting the NF- κ B pathway. *Nutrition and Cancer* **64**: p. 588-98.
- [113] Yamaguchi M, Weitzmann MN (2011) Quercetin, a potent suppressor of NF- κ B and Smad activation in osteoblasts. *International Journal of Molecular Medicine* **28**: p. 521-5.
- [114] Wang G *et al* (2013) Quercetin synergizes with 2-methoxyestradiol inhibiting cell growth and inducing apoptosis in human prostate cancer cells. *Oncology Reports* **30**: p. 357-63.
- [115] Gao X *et al* (2012) Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin on ovarian cancer. *Nanoscale* **4**: p. 7021-30.
- [116] Guo C *et al* (2012) Quercetin triggers apoptosis of lipopolysaccharide (LPS)-induced osteoclasts and inhibits bone resorption in RAW264.7 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* **30**: p. 123-36.
- [117] Russo M *et al* (2013) ABT-737 resistance in B-cells isolated from chronic lymphocytic leukemia patients and leukemia cell lines is overcome by the pleiotropic

kinase inhibitor quercetin through Mcl-1 down-regulation. *Biochemical Pharmacology* **85**: p. 927-36.

[118] Vidya PR *et al* (2010) The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *European Journal of Pharmacology* **649**: p. 84-91.

[119] Lee DH *et al* (2008) Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochemical Pharmacology* **75**: p. 2345-55.

[120] Li CJ, Elsasser TH (2005) Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: Involvement of caspase and proteasome pathways. *Journal of Animal Science* **83**: p. 89-97.

[121] Chen SF *et al* (2013) Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells. *Journal of the Chinese Medical Association* **76**: p. 146-52.

[122] Gokbulut AA *et al* (2013) Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest. *Hematology*.

[123] Ferraresi R *et al* (2005) Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radical Research* **11**: p. 1249-1258.

[124] Yi L *et al* (2007) New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition* **137**: p. 2171-84.

[125] Valko M *et al* (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: p. 44-84.

[126] Rabkin Z *et al* (2010) Do hyperglycemia and diabetes affect the incidence of false-negative 18F-FDG PET/CT studies in patients evaluated for infection or

inflammation and cancer? A Comparative analysis. *Journal of Nuclear Medicine* **51**: p. 1015-20.

[127] Moreira L *et al* (2013) Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental Cell Research*.