



**Laura
Carla Marques
Coutinho**

**Efeitos citotóxicos da hesperetina e antineoplásicos
em células U2OS**

**Laura
Carla Marques
Coutinho**

**Efeitos citotóxicos da hesperetina e antineoplásicos
em células U2OS
Cytotoxic effects of hesperetin and anticancer drugs
in U2OS cells**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Laura
Carla Marques
Coutinho**

**Efeitos citotóxicos da hesperetina e antineoplásicos
em células U2OS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor José Miguel Pimenta Ferreira de Oliveira, bolsheiro de pós doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Anabela Pinto Rolo
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutora Andreia Patrícia Henriques Ascenso
professora auxiliar da Faculdade de Farmácia de Universidade de Lisboa

orientador

Doutor José Miguel Pimenta Ferreira de Oliveira
Estagiário de Pós-Doutoramento, Cesam – Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro

agradecimentos

Desde já quero agradecer à Professora Doutora Conceição Santos e ao Doutor Miguel Oliveira, que foram os meus orientadores, por me terem aceite, por se terem responsabilizado por todo o meu trabalho, pela oportunidade que me deram em colaborar com o seu grupo de trabalho, pela simpatia, tempo disponibilizado para me orientar, pelo seu empenho, profissionalismo e rigor ao longo do meu trabalho.

Também um agradecimento a todas as pessoas que estiveram ou estão a desenvolver os seus estágios no laboratório, que partilharam conhecimentos e opiniões e que acabaram por contribuir para o meu trabalho.

Quero agradecer aos meus pais por todo o apoio incondicional, carinho, amor, paciência, por todas as oportunidades que tive, por aquilo que sou hoje e por todo o sacrifício que fizeram por mim.

Um agradecimento a toda a minha família, irmão, cunhada, sobrinhos e primos que me ajudam nos momentos de maior dificuldade e desespero, que me apoiaram incondicionalmente e que me incentivaram quando precisei.

Ao Eurico Ferreira, um agradecimento, por me ter apoiado, incentivado, ajudado nos momentos de dificuldade, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, por me ter dado um sorriso quando mais precisei, por se preocupar e por ter feito o possível para o meu bem-estar.

Por último mas não menos importantes um agradecimento a todos os meus amigos e professores que me acompanharam durante todos estes anos, sem eles não teria conseguido chegar até aqui.

palavras-chave

osteossarcoma, U2OS, hesperetina, etoposido, doxorubicina, citotóxicidade, genotoxicidade

resumo

O osteossarcoma é o tumor maligno mais comum do osso, afetando particularmente adolescentes e jovens adultos, sendo o sexo masculino o mais afetado. O tratamento da doença nem sempre é eficaz, mas com a ajuda da quimioterapia aliada à remoção da parte afetada, a qualidade de vida dos doentes tem vindo a melhorar, verificando-se um aumento de sobrevivência. Este projeto surge com o intuito de desenvolver uma terapia combinada que venha a diminuir a resistência a quimioterápicos, utilizando compostos frequentemente usados na quimioterapia (etoposido e doxorubicina) e um fitocomposto (hesperetina). Foi possível investigar os efeitos citotóxicos de fitocomposto isolado e em combinação na linha celular U2OS relativamente a diversos parâmetros celulares, nomeadamente a formação de colónias, proliferação celular, bem como a genotoxicidade e citotoxicidade. A formação de colónias foi seguida através do ensaio clonogénico, a proliferação celular foi determinada através dos ensaios de violeta de cristal (CV) e brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O potencial genotóxico e citostático foi avaliado por ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) e por análise citométrica do ciclo celular. Não ocorreram efeitos genotóxicos significativos, contudo a hesperetina isolada e em combinação induziu efeitos citostáticos, tal como observado por diminuição de índice de divisão nuclear (NDI) e alteração do perfil de fases do ciclo celular. Por comparação com agentes antineoplásicos, observou-se que também as combinações com hesperetina testadas não permitiram o desenvolvimento de colónias de U2OS. Estudos futuros de dano no ADN poderiam elucidar na melhor compreensão das alterações que estes compostos provocam nesta linha celular e a comparação com outras linhas celulares também ajudaria na compreensão.

keywords

Osteosarcoma, U2OS, hesperetin, etoposide, doxorubicin, cytotoxicity, genotoxicity

abstract

Osteosarcoma is the most common malignant tumor of the bone, occurring with more frequency in adolescents and young adults, with a greater percentage being male. The treatment is not always effective, but with chemotherapy as well as the removal of the affected section the quality of life of the patients has been increasing, together with the survival rate.

This project has the aim of developing a combined therapy that can decrease the resistance to chemotherapeutics, utilizing compounds frequently used in chemotherapy (etoposide and doxorubicin) and a phytochemical (hesperetin). It was possible to investigate the cytotoxic effects of phytochemical alone and in combination on the cell line U2OS on several parameters such as colony formation, cellular proliferation, cytotoxicity and genotoxicity. Colony formation was followed by clonogenic assay, cell proliferation was determined by crystal violet (CV) and 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assays. The cytostatic and genotoxic potential was assessed by micronucleus assay with blocked cytokinesis (CBMN) and flow cytometric cell cycle analysis. There were no significant genotoxic effects, however, the hesperetin both isolated and in combination induced cytostatic effects as observed by a decrease in nuclear division index (NDI) and modification of profile phases of the cell cycle.

Compared to antineoplastic agents, it was observed that also combinations containing hesperetin did not allow the development of U2OS colonies. Future studies of DNA damage could elucidate the alterations that these compounds cause in this cell line and a comparison with other cell lines would also increase the knowledge on the cytotoxicity and genotoxicity mechanisms.

Índice

1) Introdução	255
1.1) Cancro	255
1.1.1) Osteossarcoma.....	255
1.1.2) Linha celular U2OS	28
1.2) Compostos utilizados na quimioterapia	299
1.3) Caracterização do fitocomposto	30
1.3.1) Hesperetina.....	30
1.3) Importância do estudo do ciclo celular	32
2) Objetivos	35
3) Materiais e procedimento experimental	37
3.1) Reagentes.....	37
3.2) Cultura celular.....	37
3.3) Ensaio realizados	38
3.3.1) Ensaio clonogénico.....	38
3.3.2) Ensaio MTT	39
3.3.3) Ensaio CV.....	39
3.3.4) Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (FCM)	40
3.3.5) Ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (CBMN)	41
3.4) Análise estatística.....	43
4) Resultados	45
4.1) Capacidade de formação de colónias	45
4.2) Determinação da proliferação celular	46
4.2.1) Proliferação celular induzida por compostos isolados	466
4.2.2) Proliferação celular induzida por compostos combinados.....	48
4.3) FCM	50
4.4) Efeitos genotóxicos e citotóxicos.....	52
5) Discussão	55
6) Conclusão e perspetivas futuras	63
7) Referências bibliográficas	65
ANEXOS	71

Anexo 1.....	71
Cultura celular	71
Anexo 2.....	72
Protocolo otimizado ensaio clonogénico	72
Anexo 3.....	73
Protocolo otimizado CV.....	73
Anexo 4.....	74
Isobogramas dos respetivos ICs	74
Anexo 5.....	75
Imagens ao microscópio óptico do ensaio de CV.....	75
Anexo 6.....	78
Imagens ao microscópio de fluorescência do ensaio de CBMN	78

I) Índice de Figuras

Figura 1. Incidência do cancro no mundo em ambos os sexos ^(Ferlay, J, et al, 2012)	25
Figura 2. Taxa de incidência do osteossarcoma em homens e mulheres de diferentes idades em vários países. Os triângulos pretos correspondem à taxa de incidência em homens e os círculos cinzentos correspondem à taxa de incidência em mulheres ^(Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, 2009)	27
Figura 3. Relação entre os mecanismos de funcionamento dos flavonóides e os seus efeitos no osteossarcoma ^(Nijveldt, R, et al, 2001)	31
Figura 4. Estrutura química da hesperetina ^(Aranganathan, S e Nalini, N, 2009)	32
Figura 5. Esquema representativo das fases do ciclo celular ^(Loddo, M, et al, 2009)	33
Figura 6. Percentagem de colónias com diferentes concentrações e respetivas imagens.....	45
Figura 7. Ensaio clonogénico para os diferentes compostos.	46
Figura 8. Crescimento celular para diferentes concentrações de hesperetina, etoposido e doxorubicina..	47
Figura 9. Viabilidade celular para diferentes concentrações de hesperetina, etoposido e doxorubicina..	48
Figura 10. Crescimento celular para diferentes combinações de hesperetina e etoposido com valores do IC25 (à esquerda) e valores do IC50 (à direita)..	49
Figura 11. Crescimento celular para diferentes combinações de hesperetina e doxorubicina com valores do IC25	49
Figura 12. Viabilidade celular para diferentes combinações de hesperetina e etoposido com valores do IC25 (à esquerda) e valores do IC50 (à direita)..	50
Figura 13. Viabilidade celular para diferentes combinações de hesperetina e doxorubicina com valores do IC25.....	50
Figura 14. Percentagem de células existentes nas diferentes fases do ciclo celular quando expostas a diferentes compostos.....	52
Figura 15. Índice de divisão nuclear para os diferentes compostos e suas combinações.....	53
Figura 16. Células mono, bi, tri e tetranucleadas e respectivos danos do ADN, micronúcleo e ponte nucleoplásmica visualizados ao microscópio de fluorescência (da esquerda para a direita).....	54
Figura 17. Isoblograma do IC50 da hesperetina/etoposido.....	74
Figura 18. Isoblograma do IC25 da hesperetina/etoposido.....	74
Figura 19. Isoblograma do IC25 da hesperetina/doxorubicina	75
Figura 20. Imagens das diferentes concentrações de etoposido.....	75
Figura 21 Imagens das diferentes concentrações de doxorubicina	76
Figura 22. Imagens das diferentes combinações de hesperetina/etoposido referentes ao IC25 ...	76
Figura 23. Imagens das diferentes combinações de hesperetina/etoposido referentes ao IC50 ...	77
Figura 24. Imagens das diferentes combinações de hesperetina/doxorubicina referentes ao IC25	77
Figura 25. Imagens das combinações de hesperetina/doxorubicina ao microscópio de fluorescência	78

II) Índice de tabelas

Tabela 1. Fases do ciclo celular e mecanismos de ação dos compostos quimioterápicos ^{adaptado de} (Loddo, M, et al, 2009) (Nitiss, J, 2009)(Heiden, M, 2011)	33
Tabela 2. Diferentes ICs utilizados nos ensaios.....	48
Tabela 3. Contagem de células de acordo com o número de núcleos. A contagem aleatória contabilizou pelo menos 1000 células binucleadas.	53
Tabela 4. Frequência de diferentes tipos de anomalias nucleares por cada 1000 células binucleadas.	54

III) Lista de abreviaturas

ATCC – *American Type Culture Collection*

BN – Células Binucleadas (do inglês “Binucleate cells”)

CBMN – micronúcleos com bloqueio da citocinese (do inglês “cytokinesis block micronucleus”)

CV - Violeta de Cristal (do inglês “ crystal violet”)

DMEM – *Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

FBS – Soro Fetal Bovino (do inglês “*Fetal Bovine Serum*”)

FCM - Citometria de Fluxo (do inglês “ *Flow Cytometry*”)

MN, MNi – Micronúcleo, Micronúcleos (do inglês “ *Micronuclei, Micronucleus*”)

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (do inglês “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”)

NBUD, NBUDs - Prolapso, Prolapsos Nucleares (do inglês “*Nuclear Bud, Buds*”)

NDI – Índice de Divisão Nuclear (do inglês “*Nuclear Division Index*”)

NPB, NPBs – Ponte, Pontes Nucleoplásmicas (do inglês “*Nucleoplasmic Bridge, Bridges*”)

PBS – Tampão Salino de Fosfato (do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”)

PI – Iodeto de Propídio (do inglês “*Propidium Iodide*”)

RNase - Ribonuclease

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês “ *Sodium Dodecyl Sulfate*”)

1) Introdução

1.1) Cancro

O cancro é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (figura 1). A incidência do cancro está a aumentar em países economicamente desenvolvidos devido ao envelhecimento e crescimento da população, bem como a adoção de estilos de vida como o tabagismo, inatividade física e dietas “ocidentalizadas” (Jemal, A, Bray, F e Ferlay, J, 2011).

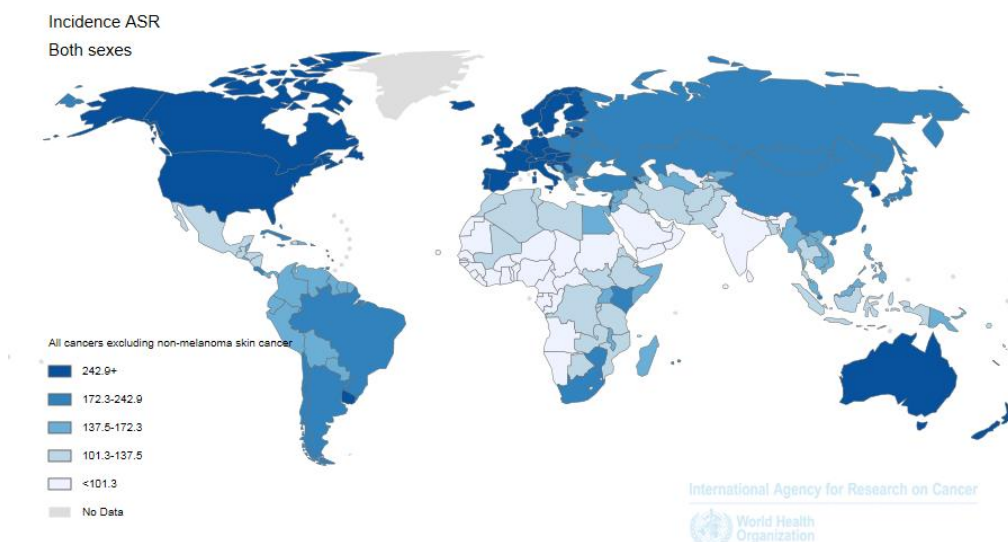


Figura 1. Incidência do cancro no mundo em ambos os sexos^(Ferlay, J, et al, 2012)

1.1.1) Osteossarcoma

O osteossarcoma deriva de células mesenquimais formadoras de ossos primitivos e é o tumor primário maligno mais comum do osso (Ottaviani, G e Jaffe, N, 2010). Representa 3-5% dos tumores na infância e menos de 1% dos tumores em idosos. Após esta doença ser detetada 80% dos doentes têm em média 5 anos de vida. Após a resseção do tumor primário mais de 80% desenvolveriam metástases caso não houvesse quimioterapia. Com a quimioterapia cerca de um terço dos pacientes desenvolvem metástases pulmonares (Khanna, C, Fan, T, Gorlick, R, et al, 2014; Siclari, V e Qin, L, 2010). Este tipo de cancro afeta as pessoas de acordo com a idade, sexo, raça e região geográfica. Vários estudos

realizados, demonstram que este tipo de cancro afeta mais homens do que mulheres, apresentando uma maior incidência em adolescentes (mais de 15 anos) e em idosos (mais de 60 anos) (Siclari, V e Qin, L, 2010). Na adolescência existem diferentes idades de incidência entre os sexos masculino e feminino, enquanto que a maior taxa se verifica no sexo feminino entre os 10 e os 14 anos, no sexo masculino acontece entre os 15 e os 19 anos, devido à puberdade ser mais precoce no sexo feminino (Mirabello, L, Troisi, R e Savage; S, 2009a) (figura 2). Dois estudos recentes, mostram que os jovens que apresentam esta doença têm uma média de crescimento mais elevada quando comparada com outros indivíduos da mesma idade (Ta, H, Dass, C, Choong, P e Dunstan, D, 2009). O país que apresenta uma maior incidência na adolescência é a Austrália, já a região que tem uma taxa mais elevada em pessoas idosas é a América Latina. A Ásia é o continente que tem a menor taxa de incidência deste tipo de cancro (Mirabello, L, Troisi, R, e Savage, S, 2009b) (figura 2).

O osteossarcoma é um tumor que produz osteóides (Siclari, V e Qin, L, 2010), podendo ser histologicamente classificado em três tipos, osteoblástico, condroblástico e fibroblástico (Longhi, A, et al, 2006). Numerosos estudos recentes descrevem que anomalias citogenéticas tanto estruturais como numéricas são encontradas neste tipo de tumor (Marina, N, et al, 2004). Está comprovado que alterações das proteínas de supressão tumoral p53 e Rb estão envolvidas na patogénese do osteossarcoma. A maioria das amostras deste tipo de cancro apresenta algum tipo de inativação combinado com a supressão tumoral das vias p53 e Rb (Ta, H, Dass, C, Choong, P e Dunstan, D, 2009).

As causas do osteossarcoma são diversas, entre as quais o ambiente a que o paciente se encontra exposto, a radiação utilizada para o combate a outros cancros ou a outros tratamentos utilizados no combate ao cancro, diferentes componentes genéticos como o doença de Paget (alargamento e deformação dos ossos) (Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, 2009b) são as mais conhecidas. Sugerem-se também outras causas como a exposição a iões metálicos (Ta, H, Dass, C, Choong, P e Dunstan, D, 2009) e mais recentemente verificou-se que a deficiência em vitamina D poderá ter influência nesta doença, mas ainda está ser

investigado (Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, 2009). Em idosos o osteossarcoma ocorre principalmente devido à existência da doença de Paget ou a pequenas lesões nos ossos, ocorrendo mais frequentemente em zonas axiais, em áreas que já tenham sido irradiadas ou que apresentem anomalias (Ferlay, J, et al, 2012; Mirabello, L Troisi, R e Savage, S, 2009b).

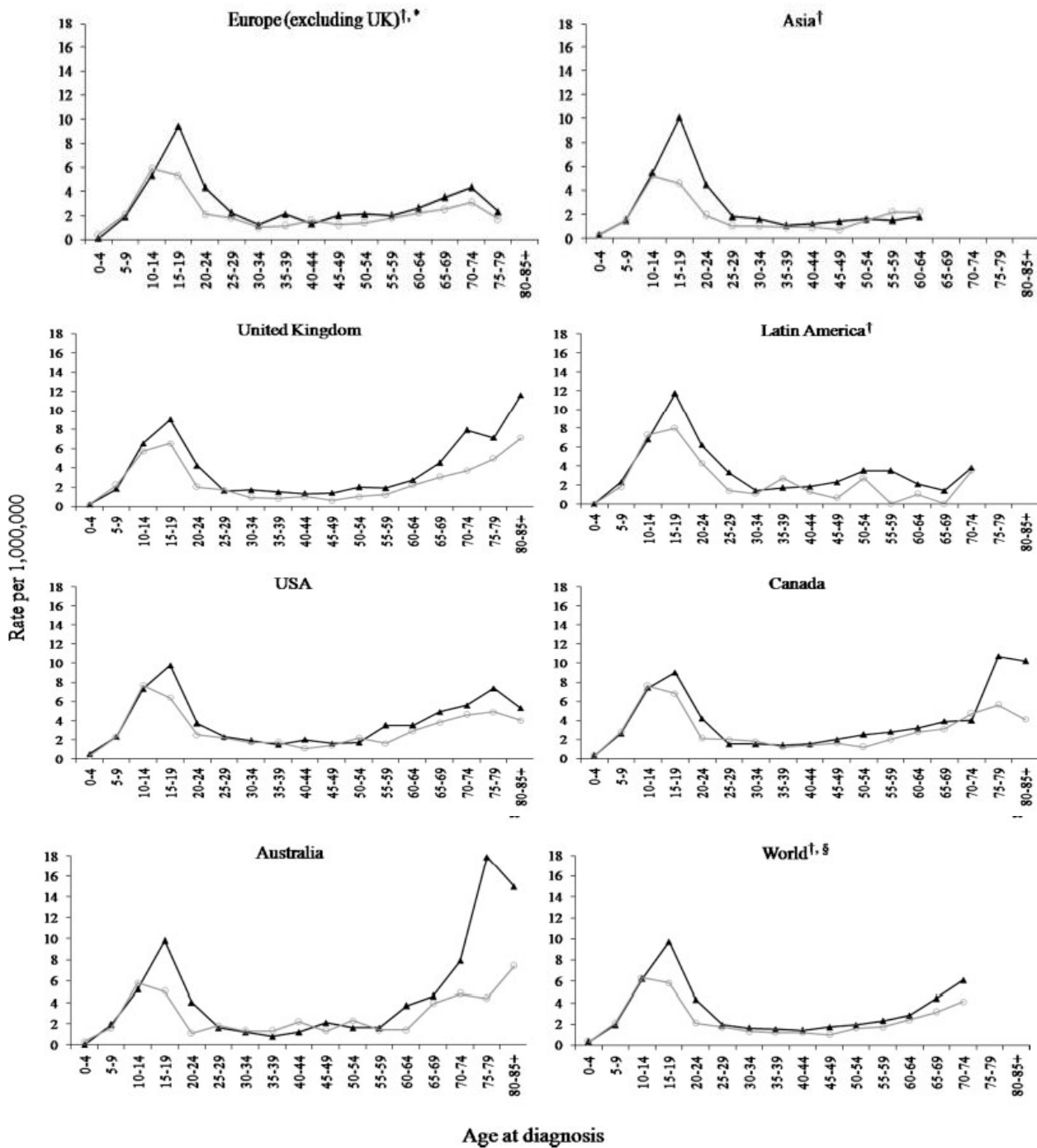


Figura 2. Taxa de incidência do osteossarcoma em homens e mulheres de diferentes idades em vários países. Os triângulos pretos correspondem à taxa de incidência em homens e os círculos cinzentos correspondem à taxa de incidência em mulheres (Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, 2009)

No passado, o principal tratamento para o osteossarcoma era a ressecção cirúrgica completa, mas infelizmente a taxa de sobrevivência era apenas entre 15 e 20% e os doentes geralmente acabavam por desenvolver metástases pulmonares (Khanna, C, Fan, T, Gorlick, R, et al, 2014). Os tratamentos utilizados atualmente são multiagentes de quimioterapia e ressecção cirúrgica (Nagarajan, R, et al, 2012). Embora as taxas de sobrevivência tenham aumentado de 20 para 75% devido à combinação da cirurgia com a quimioterapia neo-adjuvante, não é possível aplicar a mesma forma de tratamento em todos os casos, pois o tamanho do tumor é um fator importante assim como a reação do doente aos tratamentos e à cirurgia (Trieb, K, et al, 2003).

As escolhas para o tratamento do osteossarcoma são poucas, mas têm vindo a aumentar a sua taxa de sucesso. Hoje em dia o tratamento padrão de doentes com este tumor consiste na combinação de quimioterapia e a remoção da parte afetada. A radioterapia pode também ser aplicada no tratamento programado juntamente com a ressecção cirúrgica (Ta, H, Dass, C, Choong, P e Dunstan, D, 2009).

1.1.2) Linha celular U2OS

Existem diferentes tipos de linhas celulares de osteossarcoma, como por exemplo, SAOS-2, MG-63 e U2OS. A linha celular U2OS é uma das primeiras linhas de células geradas sendo usada em várias áreas de pesquisa biomédica. Dois genes supressores de tumores, p53 e Rb encontram-se funcionais nesta linha celular, enquanto que em outras linhas celulares como as SAOS-2 encontram-se mutados (Niforou, K, et al, 2008).

Quando comparadas com outras linhas celulares de osteossarcoma, esta linha apresenta menores níveis de variações numéricas nos cromossomas e apenas 2% das células têm mitoses multipolares, semelhantes aos fibroblastos de controlo normais, devido à p53 e à Rb se encontrarem funcionais (Niforou, K, et al, 2008; Diller, L, et al, 1990). Num estudo realizado nesta linha celular, os marcadores de osteoblastos não se encontravam presentes, já os marcadores de cartilagem como colagénio II, IV, IX e X encontravam-se presentes. Por este

motivo, esta linha não é consistentemente classificada como osteoblástica mas como fibroblástica (Pautke, C, et al, 2004)

1.2) Compostos utilizados na quimioterapia

Atualmente a primeira escolha para o tratamento do osteossarcoma é a quimioterapia com a administração de alguns fármacos como a doxorrubicina, cisplatina, ciclofosfamida, metotrexato e etoposido usados sozinhos ou em combinação (Evdokiou, A, et al, 2002).

O etoposido é uma podofilotoxina sintética que foi sintetizado em 1978, demonstrando propriedades antitumorais. Este composto age contrariamente à maioria dos fármacos existentes que têm como alvo enzimas específicas, em vez de bloquear a clivagem simultânea nas duas cadeias do ADN, o etoposido bloqueia independentemente a clivagem de uma ou outra cadeia. Resulta daqui uma acumulação de fragmentos de ADN de cadeia simples durante a replicação (Bromberg, K, Burgin, A, e Osheroff, N, 2003).

A doxorrubicina pertence ao grupo das antraciclinas e foi desenvolvida na década de 1960. Desde então tem-se vindo a desenvolver outras antraciclinas com o objetivo de melhorar a sua eficácia terapêutica (Leonard, R, et al, 2009; Jantas, D e Lason, W, 2009). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para este tipo de compostos, entre eles, a formação de radicais livres, peroxidação lipídica ou danos no ADN, intercalação no ADN que leva a uma inibição da síntese de macromoléculas, alquilação, interferência com o desenrolamento do ADN ou a separação das cadeias de ADN e efeitos diretos na membrana. Os mais bem caracterizados, são as interações com o complexo ADN-topoisomerase II ou a formação de ligações covalentes e modificações de base, que são responsáveis por distúrbios na replicação do ADN e na transcrição levando a célula à indução de reparação do ADN ou à morte celular programada, apoptose (Szulawska, A e Czyz, M, 2006; Takemura, G e Fujiwara, H, 2007). A doxorrubicina pode interagir directamente com os pares de bases do ADN interferindo na sua replicação ou pode inibir o complexo ADN-topoisomerase II, inibindo a replicação do ADN, considerando que a formação do complexo doxorrubicina-ADN-topoisomerase II evita a reparação da cadeias de ADN

quebradas, este composto também provoca danos na membrana celular (Takemura, G e Fujiwara, H, 2007).

Apesar de todos os fármacos desenvolvidos, a quimioterapia pode falhar devido à resistência desenvolvida pelas células tumorais aos compostos (Evdokiou, A, et al, 2002; Eckford, P e Sharom, F, 2009). A aplicação destes compostos levanta outros problemas como por exemplo as doenças malignas secundárias, a cardiotoxicidade, toxicidade nos pulmões, levando também a mucosite e a mielossupressão quando combinado com a radioterapia (Takemura, G e Fujiwara, H, 2007; Gurjal, A, et al, 1999). Surge assim a necessidade de desenvolvimento de novas terapias combinadas que sejam mais eficazes e diminuam a resistência aos fármacos.

1.3) Caracterização do fitocomposto

1.3.1) Hesperetina

Foi reconhecido durante anos que uma dieta rica em vegetais e frutas protege o organismo contra doenças crônicas. Atualmente há um grande interesse em compostos fenólicos nomeadamente os flavonóides (Erlund, I, et al, 2001).

Os flavonóides são um grande grupo de compostos presentes nas plantas. Até ao momento, mais de 6000 flavonóides foram identificados (Beecher, G, 2003). Os flavonóides são consumidos regularmente na dieta humana e existem em frutos, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules, flores, bem como chá e vinho tinto. Estes compostos encontram-se divididos em subgrupos como flavonóis, antocianidinas, flavonas, flavononas e chalconas de acordo com a sua estrutura molecular. Estudos epidemiológicos sugerem uma relação positiva, entre o consumo de frutas cítricas ou o seu sumo e acidentes cardiovasculares, cancro, e outros (Erlund, I, et al, 2001; Nijveldt, R, et al, 2001; Middleton, E, Kandaswami, C e Theoharides, T, 2000) (ver figura 3). Os citrinos mais comuns utilizados na alimentação contêm grandes quantidades de flavononas tais como hesperetina e naringenina. Estes compostos possuem

propriedades anticancerígenas e antioxidantes (Erlund, I, et al, 2001) sendo de entre os dois o mais estudado a naringenina (Erlund, I et al, 2002).

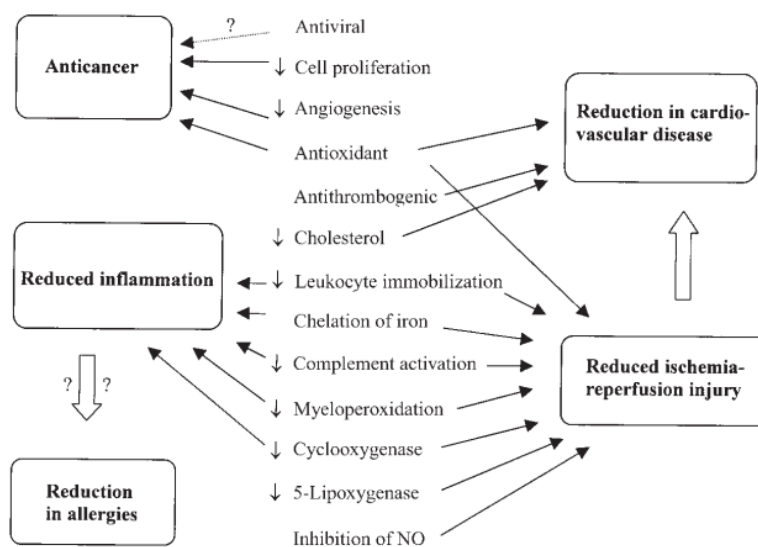


Figura 3. Relação entre os mecanismos de funcionamento dos flavonóides e seus efeitos no osteossarcoma (Nijveldt, R, et al, 2001)

Sabe-se que a hesperetina (3,5,7-trihidroxi-4-metoxil flavonona) (figura 3), é um dos mais abundantes flavonóides que se encontra na casca dos citrinos (Gil-Izquierdo, A, et al, 2001). Este composto apresenta propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-hipertensivas, anti-aterogênicas e antialérgicas tendo estas propriedades sido comprovadas em ratinhos (Erlund, I et al, 2002; Garg, A, et al, 2001; Mishra, P, et al, 2009). Este composto foi investigado em vários estudos sobre cancro, (pulmão, próstata, estômago, colorretal e mama) onde se verificou que este composto levou à apoptose das células afetadas (Neuhouser, M, 2009; Aranganathan, S e Nalini, N, 2009; Zhang, S, Yang, X e Morris, M, 2004). Investigadores verificaram que este composto reduziu a capacidade de metastização em ratinhos com melanomas (Lentini A, et al, 2007). Recentemente, um estudo verificou que a hesperetina é um possível indutor de NOTCH-1, que nestas células inibe o crescimento celular, e é um supressor de tumor gastrointestinal (Zarebczan, B, et al, 2011). Como demonstrado na bibliografia a hesperetina apresenta propriedades anticancerígenas, que não estando descritas para esta linha celular, são relevantes para o seu estudo.

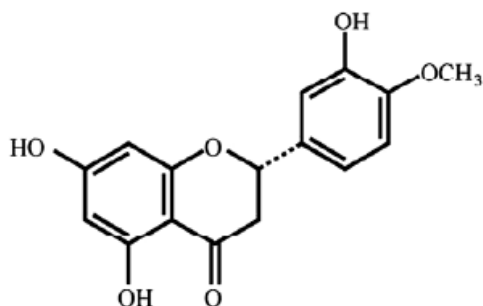


Figura 4. Estrutura química da hesperetina (Aranganathan, S e Nalini, N, 2009)

1.4) Importância do estudo do ciclo celular

O ciclo celular representa uma série de acontecimentos altamente regulados, que levam à reprodução de células eucarióticas. Este ciclo é dividido em duas fases, a interfase e a mitose (fase M). A interfase é subdividida em G1, em que ocorre síntese de RNA e proteínas, em S onde o ADN é replicado e os cromossomas são duplicados e em G2 onde ocorre o crescimento e síntese de macromoléculas. Na fase M a célula entra em divisão. No caso particular da fase G0 a célula possui a mesma quantidade de ADN da fase G1 sem no entanto crescer e iniciar a replicação de ADN. (Loddo, M, et al, 2009; Vermeulen, k, Bockstaele, D e Berneman, Z, 2003) (ver Figura 5).

Nos cancros, há uma elevada proporção de células em divisão e por esta razão muitos dos agentes quimioterápicos actuam especificamente na divisão celular (Loddo, M, et al, 2009) (ver tabela 1).

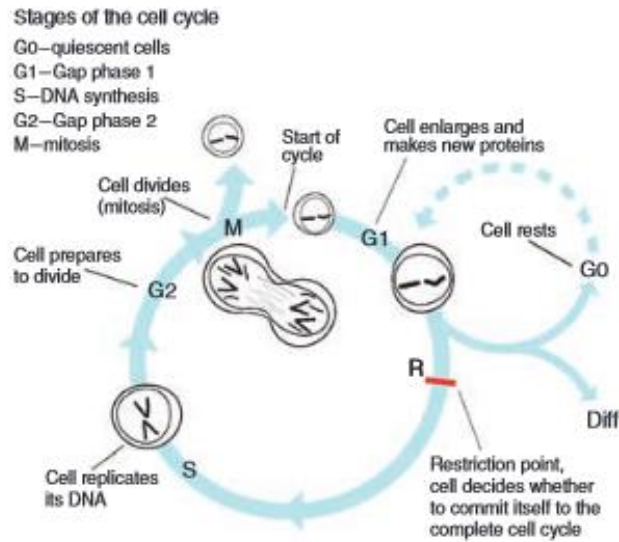


Figura 5. Esquema representativo das fases do ciclo celular (Loddo, M, et al, 2009)

Tabela 1. Fases do ciclo celular e mecanismos de ação dos compostos quimioterápicos (adaptado de (Loddo, M, et al, 2009; Nitiss, J, 2009; Heiden, M, 2011))

Fármaco	Alvo	Mecanismo de ação	Fase geralmente afetada
Cisplatina	ADN	Liga-se ao ADN originando ligações inter e intracadeias, induzindo alterações estruturais	G1/S ou G2/M
Metotrexato (MTX)	Diidrofolato redutase	Inibição do metabolismo do ácido fólico	S
Etoposido	Topoisomerase II	Inibição da Topoisomerase II	S ou G2/M
Doxorrubicina	Topoisomerase II	Inibição da Topoisomerase II	G2/M

2) Objetivos

Os quimioterápicos utilizados na terapia do osteossarcoma apresentam toxicidade para diferentes tecidos, podem provocar malignidade secundária e quando combinados com a radioterapia provocam mielossupressão. Para além disto é possível a ocorrência de resistência aos quimioterápicos por parte do osteossarcoma. Desta forma é necessário realizar terapias combinadas para que haja uma diminuição dos efeitos tóxicos em células normais e uma prevenção da quimiorresistência em células tumorais.

A hesperetina é uma potencial droga para ser utilizada na linha de osteossarcoma U2OS, pois apesar desta linha celular apresentar os genes de p53 e Rb funcionais possui diferenças relativamente a diversos marcadores osteoblásticos. Sendo que este fitocomposto apresenta propriedades anticancerígenas em diferentes linhas celulares, o estudo dos seus efeitos é relevante também para a linha U2OS.

Com o intuito de verificar se este composto seria eficaz no combate a esta linha celular foram realizadas exposições individuais e em combinação, para análise de viabilidade, crescimento celular e dos efeitos da exposição a longo prazo, bem como deteção de possíveis alterações na divisão celular e indução de danos de ADN.

3) Materiais e procedimento experimental

Os reagentes e as soluções utilizadas, têm a seguinte proveniência: A L-glutamina, meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), tripsina-EDTA, FBS, fungizona, PBS e penicilina/estreptomicina foram adquiridos através da Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. A hesperetina, SDS, MTT, dimetilsulfóxido (DMSO), PI e RNase provêm de: Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO, EUA). A linha celular U2OS (American Type Culture Collection - ATCC, Vanassas; VA, EUA) foi obtida por colaboração com o Professor Everardus van Zoelen. A doxorubicina obteve-se através de Cayman Europe, (Tallinn, Estónia). O etoposido, CV, laranja de acridina e etanol foram do fabricante Merck Millipore, (Billerica, MA, EUA). A citocalasina-B proveio de AppliChem (Omaha, NE, EUA).

3.1) Reagentes

Os compostos a testar foram previamente dissolvidos em DMSO, obtendo-se "Stocks" concentrados de hesperetina (200 mM), doxorubicina (41,4 mM), e etoposido (60 mM). A partir dos stocks concentrados, fizeram-se as várias diluições em meio DMEM completo. Foram adicionadas a todas as concentrações testadas incluindo o controlo (sem fármaco a testar) 0,1% de DMSO.

3.2) Cultura celular

De forma a manter a integridade da linha celular e das condições experimentais, empregaram-se técnicas de cultura celular estritamente asséticas.

A linha de osteossarcoma humano U2OS foi propagada e cultivada em DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 2 mM L-glutamina, 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e 2.5 µg/ml de fungizona. Para descongelar as células, adicionou-se 8 ml de meio DMEM completo a 37 °C a frascos de 75 cm² de área superficial de fundo. As células foram descongeladas rapidamente, em banho-maria e adicionadas lentamente ao meio. Após 24 horas verificou-se a adesão das células ao frasco por microscopia, e substituiu-se o meio (ver anexo 1).

A propagação foi realizada em incubadora a 37 °C e em atmosfera com 5% de CO₂.

Quando as placas se encontravam quase confluentes fez-se uma divisão de 1:5, sendo propagadas duas vezes por semana.

Para cada tipo de ensaio, as células semeadas foram deixadas a aderir a cada poço durante pelo menos 16 horas antes de cada exposição a agentes químicos.

3.3) Ensaio realizados

3.3.1) Ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico é frequentemente utilizado para verificar a sobrevivência de células cancerígenas após irradiação (Buch, K, et al, 2012) mas também pode ser utilizado para determinar a eficácia de agentes químicos citotóxicos. Baseia-se na capacidade de uma única célula formar uma colónia (contém 50 ou mais células). O ensaio testa essencialmente a capacidade de todas as células de uma população sofrerem divisão ilimitada (Franken, N, et al, 2006).

Para avaliação de colónias, as células foram semeadas em placas de 6 poços (50 células/poço) e deixadas a aderir durante a noite. Após adesão, o meio foi substituído por meio de exposição contendo hesperetina, etoposido, doxorrubicina e combinações fitocomposto-agente antineoplásico. Após exposição e lavagem com PBS, as células foram tripsinizadas. Em seguida inativou-se com 600 µl de meio de cultura e contou-se na câmara de Neubauer as células. Semeou-se uma nova placa de 6 poços de maneira a que o número de colónias no final do ensaio se situasse entre 20 e 150. Incubou-se durante 2 semanas o tempo estimado para formação de colónias. Após esta incubação, o meio de cultura foi retirado, lavou-se com 2 ml de PBS, fixou-se e corou-se as colónias com 1 ml da solução de violeta de cristal (0,2% violeta de cristal e 10% etanol) durante 30 minutos. Por fim, lavou-se o excesso de violeta de cristal com água destilada, colocou-se a placa virada para baixo e deixou-se secar durante a noite. Seguidamente foi feita a contagem de colónias (mínimo 50 células)

presentes com a ajuda do microscópio ótico invertido. Este protocolo sofreu algumas alterações (ver anexo 2)

3.3.2) Ensaio MTT

O ensaio de MTT permite determinar a citotóxicidade de substâncias ativas em linhas celulares tumorais humanas (Buch, K, et al, 2012). É um ensaio colorimétrico, quantitativo e sensível que determina a viabilidade celular por intermédio da atividade metabólica (Gerlier, D e Thomasset, N, 1986). O ensaio é baseado na capacidade de as enzimas desidrogenases que se encontram na mitocôndria clivarem os anéis tetrazólio do MTT formando cristais de formazano de cor roxa, que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos (Buch, K, et al, 2012; Fotakis, G e Timbrell, J, 2006).

Este ensaio foi realizado em placas de 24 poços tendo-se semeado 2×10^5 células/poço.

Após o tempo necessário para adesão celular à placa verificou-se no microscópio ótico invertido se as células se encontravam aderidas. Em seguida, retirou-se o meio de cultura, adicionou-se 600 µl dos compostos a testar (hesperetina, etoposido, doxorubicina e combinações) e colocou-se na incubadora durante 48 horas, consoante os tempos definidos. Após o tempo de exposição, adicionou-se 300 µl de MTT (1 mg/ml em PBS) preparado de fresco e incubou-se durante 4 horas a 37 °C, 5% CO₂. Com a ajuda de uma seringa foi removido o meio de cultura e o reagente MTT, adicionou-se 900 µl de DMSO e colocou-se a placa a agitar num agitador orbital durante 2 horas até os cristais se encontrarem dissolvidos, protegendo a placa da luz. Por fim fez-se a leitura da placa a 570 nm num espectrofotómetro.

3.3.3) Ensaio CV

O ensaio de CV é sensível, sendo utilizado para testar diversos compostos, pois é rápido e económico (Ishiyama, M, et al, 1996). Este ensaio baseia-se na capacidade de as células permitirem a entrada do corante e depois de fixadas reterem-no, determinando o número relativo de células (Chiba, K, Kawakami, K e Tohyama, K, 1998). É um corante utilizado para determinar o crescimento celular,

corando o citoplasma e o núcleo de cor roxa em células viáveis (Ishiyama, M, et al, 1996; Chiba, K, Kawakami, K e Tohyama, K, 1998).

Este protocolo também sofreu algumas alterações em relação ao original (ver anexo 3).

Este ensaio foi realizado em placas de 24 poços e o número de células semeadas foram de 2×10^5 células/poço.

Após a adesão celular retirou-se o meio de cultura e expôs-se as células aos diferentes compostos, hesperetina, etoposido, doxorubicina e combinações, (volume por poço 600 μ l) durante 48 h. Após a exposição, o meio das células foi retirado, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 600 μ l da solução de violeta de cristal (0,2% de violeta de cristal com 10% de etanol) durante 30 minutos. Após coloração, retirou-se o violeta de cristal, lavou-se com água destilada e adicionou-se 600 μ l da solução 1% de SDS durante 60 minutos com agitação. Por fim fez-se a leitura das absorvâncias da solução a 570 nm em espectrofotômetro.

3.3.4) Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (FCM)

A FCM é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Este método permite analisar em simultâneo e de forma rápida várias características físicas e químicas de células em suspensão através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico (citômetro) (Brown, M e Wittwer, C, 2000). Neste aparelho, um feixe de luz de um único comprimento de onda (laser) é direcionado para um meio líquido em fluxo. São apontados vários detetores ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz, nomeadamente um na linha do feixe de luz (forward scatter, FCS) e vários perpendiculares ao mesmo feixe (side scatter, SSC), além dos detectores fluorescentes. Cada partícula em suspensão, ao passar no feixe, vai dispersar a luz de uma determinada 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 (Barlogie, B, et al, 1983; Bernas, T, et al, 2006).

Para avaliação de distribuição de ciclo celular, as células foram semeadas em placas de 6 poços (6×10^5 células/poço) e deixadas a aderir durante a noite. Após adesão, o meio foi substituído por meio de exposição contendo hesperetina, etoposido, doxorubicina e combinações. No final de cada tempo de incubação observou-se ao microscópio ótico invertido, em seguida lavou-se com 2 ml de PBS e tratou-se com 300 μ l de tripsina-EDTA e inactivou-se com 600 μ l de meio de cultura. Removeu-se dos poços as células em suspensão colocou-se em eppendorfs de 1,5 ml e centrifugou-se durante 10 minutos a 600 g. Retirou-se o sobrenadante com cuidado e ressuspendeu-se o pellet com 700 μ l de PBS. Centrifugou-se novamente a 600 g durante 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 1 ml de etanol a 85% a 4 °C. Foi mantido a -20 °C até a análise.

Antes de se realizar a análise, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 600 g durante 10 minutos, em seguida retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 800 μ l de PBS e vortexou-se. Por fim, filtrou-se com malha de nylon, adicionou-se 50 μ l *ribonuclease* (RNAse) e 50 μ l de iodeto de propídio (PI) e incubou-se durante 20 minutos no escuro. As propriedades relativas de dispersão da luz, dispersão lateral (SS) e de dispersão para a frente (FS), bem como a intensidade de fluorescência relativa de núcleo corado com PI foram medidos com um fluxo Beckman Coulter EPICS XL cirtómetro (Coulter Electronics, Hialeah, FL-EUA). O instrumento foi equipado com um laser de ião-árgon refrigerado a ar, sintonizado em 15 mW e operando em 488 nm. As aquisições foram feitas utilizando o software IITM SISTEMA v. 3.0 (Beckman Coulter, Hialeah, FL-EUA). A amplificação foi ajustada de modo que o pico correspondente às células em fase G0/G1 do ciclo celular fosse posicionado no canal 200. Para cada amostra, o número de eventos analisados foi de aproximadamente 5000. A análise do ciclo celular foi realizada usando o software FlowJo (ár Inc., Ashland, Oregon, EUA). Os resultados foram expressos em percentagem de núcleos na fase G0/G1, S e fase G2 do ciclo celular.

3.3.5) Ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (CBMN)

Este ensaio determina danos no ADN, a citotoxicidade e a citostase. Os danos no ADN são avaliados pelo número de células binucleadas (BN) com micronúcleos (MNI), pontes nucleoplásmicas (NPBs) e prolapsos nucleares (NBUDs). Os efeitos de citostase são verificados através da frequência de células mono e multi nucleadas. Por último a citotoxicidade é medida através dos índices de apoptose e necrose celular (Fenech, M, 2007).

Para a verificação dos efeitos de citostase, citotoxicidade e danos no ADN algumas regras devem ser seguidas. Em primeiro lugar devem ser contadas as células viáveis, mono, bi e multinucleadas num mínimo de 500 células no total. São consideradas células mono ou multinucleadas, as células que apresentem um citoplasma intacto e núcleo normal, podendo ou não conter MNI, NBUDs e NPBs, as células que se encontram em apoptose ou necrose não devem ser incluídas. Os MNI, NPBs e NBUDs devem ser contados em pelo menos 1000 células viáveis binucleadas mas apenas se o índice de divisão nuclear (NDI) for superior a 1,2. Os dois núcleos em uma célula BN podem-se tocar, mas não se devem sobrepor. Relativamente ao seu aspeto devem ser aproximadamente iguais em tamanho, padrão, coloração e intensidade de coloração. O NDI calcula-se de acordo com o método de Eastmond and Tucker (Eastmond, D e Tucker, J, 1989), através da fórmula $NDI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / N$, em que M_1 - M_4 representam o número de células com 1-4 núcleos e N é o número total de células viáveis contadas (excluindo as células necróticas e apoptóticas)

O valor mais baixo possível para o NDI é 1,0, significa que nenhuma das células viáveis se dividiu, sendo todas mononucleadas. Se todas as células viáveis tiveram completado em média uma divisão então o NDI será de 2,0. Este só será superior se algumas células (em média) tiverem completado mais do que uma divisão (Fenech, M, 2007).

No início começou-se por colocar uma lamela esterilizada em cada poço (placas de 6 poços) e as células foram semeadas (6×10^5 células/poço) e deixadas a aderir durante a noite. Após adesão, o meio foi substituído por meio de exposição contendo hesperetina, etoposido, doxorubicina e combinações. No fim

do tempo de incubação observou-se ao microscópio ótico invertido, removeu-se o meio de cultura e adicionou-se 2,5 µg/ml de citocalasina B. Esta concentração foi previamente determinada, ou seja, várias concentrações foram testadas para este tipo de células e verificou-se que 2,5 µg/ml seria o ideal para que as células do grupo de controlo ao fim de 30 horas não apresentassem micronúcleos. Deixou-se incubar durante 30 horas. Após esse tempo, lavou-se com 2 ml de PBS e colocou-se 1 ml de metanol absoluto a 4°C durante 15 minutos para fixar as células. Em seguida o metanol foi retirado e com a ponta de uma seringa levantou-se a lamela e colocou-se numa caixa a secar.

Para analisar as lamelas hidratou-se durante 5 minutos em água, corou-se durante 30 segundos com laranja de acridina, e retirou-se os excessos com água. A parte da lamela que continha as células foi colocada sobre uma lâmina e posteriormente foi visualizada ao microscópio de fluorescência Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão).

3.4) Análise estatística

Para os diferentes tipos de ensaio com exposição a hesperetina realizaram-se quatro ensaios independentes. Para os restantes compostos realizaram-se três ensaios independentes e foram feitas duas réplicas técnicas por ensaio.

As concentrações inibidoras a 50% (IC50) e a 25% (IC25) foram determinadas a partir dos ensaios de MTT e CV, utilizando o programa R para Windows versão 3.1.1 (Core Team, VIE, Áustria), a partir dos pacotes estatísticos *drm* e *drc*.

A análise estatística foi realizada utilizando SigmaPlot para Windows versão 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA-EUA). O método estatístico usado foi o de Holm-Sidak com análise de variância one-way ANOVA para os ensaios de MTT, CV e clonogénico; e two-way ANOVA para análise do ciclo celular. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.

4) Resultados

4.1) Capacidade de formação de colónias

Após a recuperação celular para o fitocomposto hesperetina, verificou-se que, a percentagem de colónias formadas era mais elevada em concentrações mais baixas, sendo visíveis várias colónias nas placas (Figura 6)

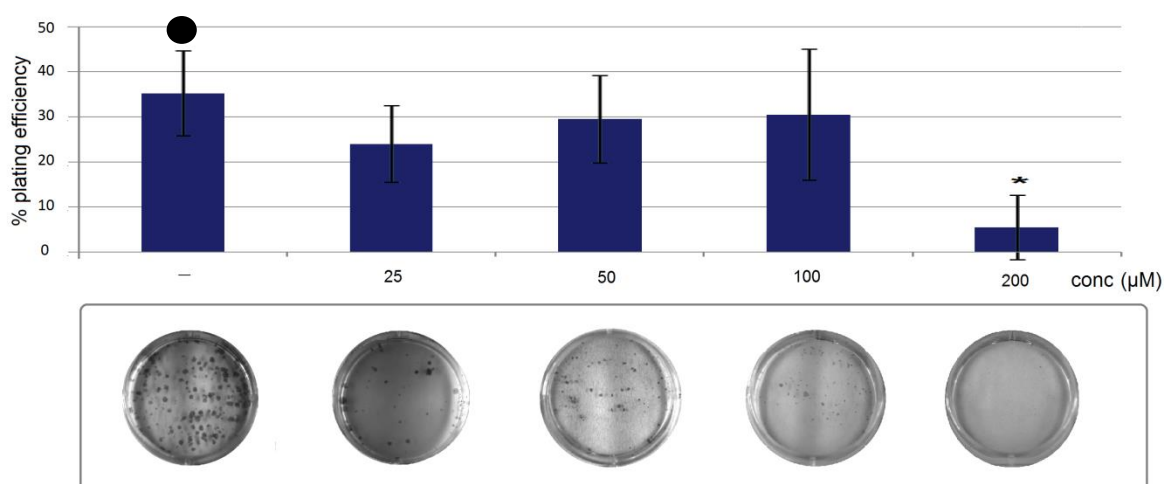


Figura 6 Percentagem de colónias com diferentes concentrações de hesperetina e respetivas imagens. * as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (●4). Não foram contabilizadas colónias com agregados de células elevados.

As concentrações testadas de agentes antineoplásicos, apesar de não terem sido excessivamente citotóxicas a 48 horas de exposição (baseado nos dados de CV e MTT), quando utilizadas em longa exposição não permitiram a formação de colónias. O mesmo se verificou para as combinações testadas. (Figura 7).

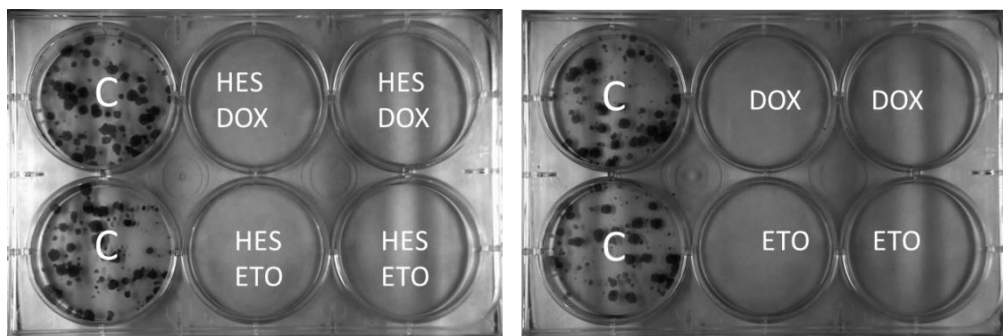


Figura 7. Ensaio clonogénico para os diferentes compostos.

C: controlo; HES: hesperetina; ETO: etoposido; DOX: doxorubicina. À esquerda as combinações teóricas de IC₂₅ HES/DOX (281 + 0,125 e 151 + 0,22 μ M) e de HES/ETO (281 + 6,5 e 151 + 11,4 μ M). À direita as concentrações de DOX foram (0 μ M; 0,26 μ M; 0,3 μ M) e de ETO (0 μ M; 3 μ M; 17 μ M).

4.2) Determinação da proliferação celular

4.2.1) Proliferação celular induzida por compostos isolados

Após a realização do ensaio de CV, verificou-se uma diminuição do crescimento celular dependente da dose. O ensaio de CV reflete a confluência após exposição ao composto, ou seja, a confluência vai diminuindo à medida que há um aumento da concentração do composto. Para a gama de concentrações testadas de hesperetina, as concentrações 500 μ M e 1000 μ M apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o controlo; para o etoposido não existiram diferenças estatisticamente significativas e para a doxorubicina a concentração de 0,4 μ M manifestou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ver figura 8).

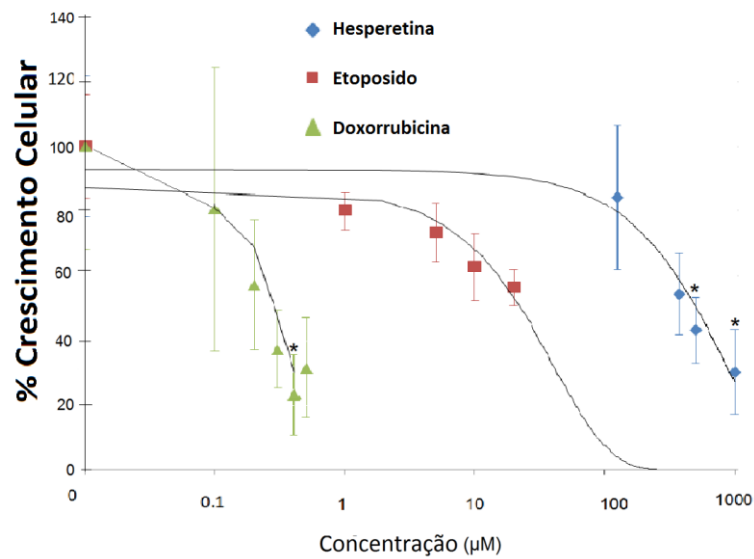


Figura 8. Crescimento celular para diferentes concentrações de hesperetina, etoposido e doxorrubicina. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$).

A percentagem de viabilidade celular foi determinada a partir do ensaio de MTT para os diferentes compostos, hesperetina, doxorrubicina e etoposido. Registou-se uma diminuição de viabilidade celular dependente da dose. No caso da hesperetina ocorreram diferenças estatisticamente significativas para as concentrações de 125 μM , 500 μM e 1000 μM . Mas no caso de 125 μM de hesperetina a viabilidade aumentou. Para o etoposido as concentrações de 10 μM , 20 μM e 25 μM mostraram diferenças estatisticamente significativas. Para a doxorrubicina apenas a concentração de 0,5 μM apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o controlo (ver figura 9).

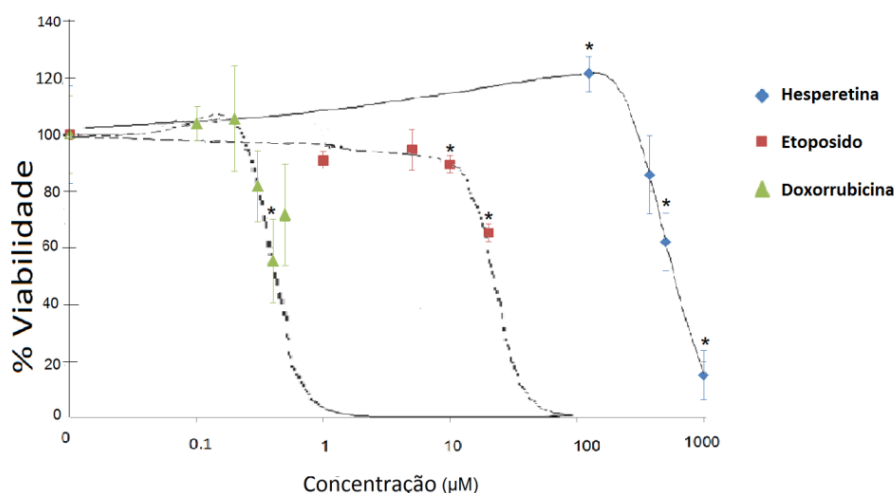


Figura 9. Viabilidade celular para diferentes concentrações de hesperetina, etoposido. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$).

Através dos modelos Brain Cousens e Cedergreen-Ritz-Streibig obtidos pelo programa estatístico R foi possível calcular os ICs das combinações, a partir dos resultados obtidos por ensaio de MTT.

Procedeu-se às análises do isoblograma, partindo dos ICs calculados pelos modelos anteriormente referidos. Nesta análise a linha oblíqua representa aditividade de efeito, fora da linha temos efeitos sinérgicos ou antagônicos, dependendo da região onde se situarem (ver anexo 4). A tabela 2 mostra os ICs calculados.

Tabela 2 Diferentes ICs utilizados nos ensaios. HES: hesperetina; ETO: etoposido; DOX: doxorubicina

	IC5 (µM)	IC25 (µM)	IC50 (µM)
HES	335	450	653
ETO	3	17	23
DOX	0,26	0,33	0,42

4.2.2) Proliferação celular induzida por compostos combinados

Através da figura 10, (dados obtidos através do ensaio de CV) pode-se ver na figura da esquerda (IC25), que ambas as combinações de hesperetina/etoposido apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Na figura da direita (IC50), duas das três combinações testadas apresentam diferenças estatisticamente significativas, apresentando uma redução no crescimento celular de 50%.

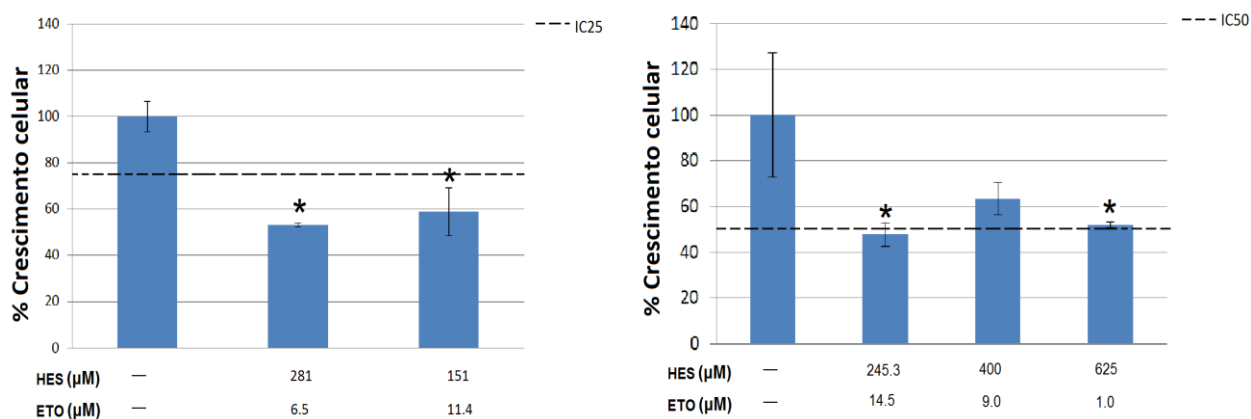


Figura 10. Crescimento celular para diferentes combinações de hesperetina e etoposido com valores do IC25 (à esquerda) e valores do IC50 (à direita). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). HES: hesperetina; ETO: etoposido.

As combinações de hesperetina/doxorubicina não apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo. No entanto, ocorre uma diminuição do crescimento celular à medida que a concentração de hesperetina diminui e a concentração de doxorubicina aumenta (ver figura 11).

Os dados obtidos nos gráficos são concordantes com as imagens do microscópio (ver anexo 5).

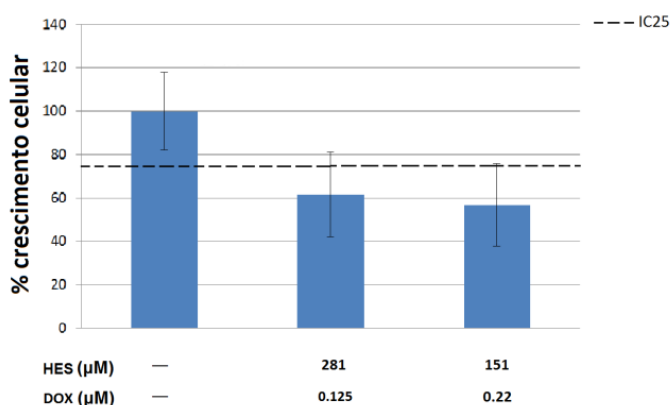


Figura 11. Crescimento celular para diferentes combinações de hesperetina e doxorubicina com valores do IC25. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). HES: hesperetina; DOX: doxorubicina.

A análise de isoblogramas de IC25 e IC50 indicou que dependendo da combinação utilizada, os efeitos poderiam ser mais próximos da aditividade, sinergismo ou antagonismo (Figs. 12 e 13). Relativamente a combinações com

etoposido para o IC25, ambas as exposições tiveram um efeito antagónico, já para o IC50 a combinação de 625 μM hesperetina+1,0 μM etoposido apresentam um efeito sinérgico significativo quando comparada com o controlo. Quanto às combinações com doxorrubicina ambas resultaram em menor citotoxicidade sendo uma delas significativamente antagónica.

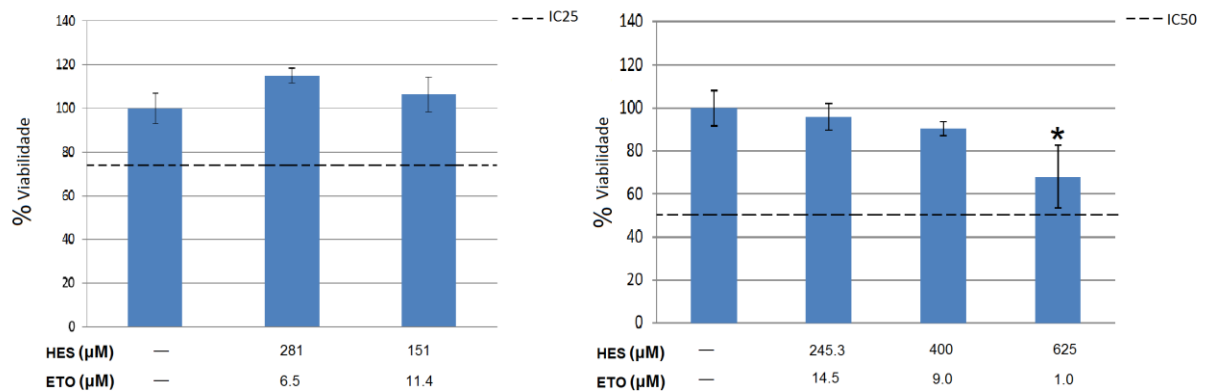


Figura 12. Viabilidade celular para diferentes combinações de hesperetina e etoposido com valores do IC25 (à esquerda) e valores do IC50 (à direita). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). HES: hesperetina; ETO: etoposido.

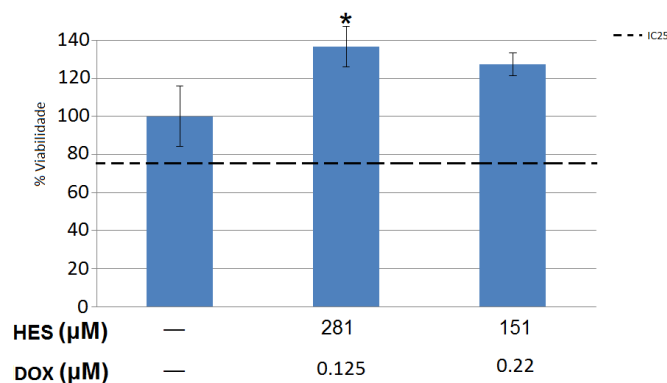


Figura 13. Viabilidade celular para diferentes combinações de hesperetina e doxorrubicina com valores do IC25. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). HES: hesperetina; DOX: doxorrubicina.

4.3) FCM

Através da distribuição do ciclo celular verificou-se que a hesperetina provocou uma diminuição na fase S e um aumento na percentagem de células na fase G2/M. O mesmo verificou-se para os quimioterápicos.

Apesar de serem utilizados os mesmos ICs nas diferentes combinações, no caso da combinação com o etoposido o perfil é mais semelhante ao do etoposido em separado, enquanto que no caso da combinação com doxorubicina, o seu perfil é diferente do perfil dos compostos isolados. No entanto, observaram-se as seguintes diferenças, para a concentração de 281 μM hesperetina + 6,5 μM etoposido existe uma grande percentagem de células em fase G2/M, enquanto que para 281 μM hesperetina + 0,125 μM doxorubicina provoca um aumento na percentagem de células em fase S. Já 151 μM hesperetina + 11,4 μM etoposido aumentam a proporção de células em fase S e G2/M enquanto que a mesma combinação de IC25 com doxorubicina provoca apenas aumento da fase S (Figura 14).

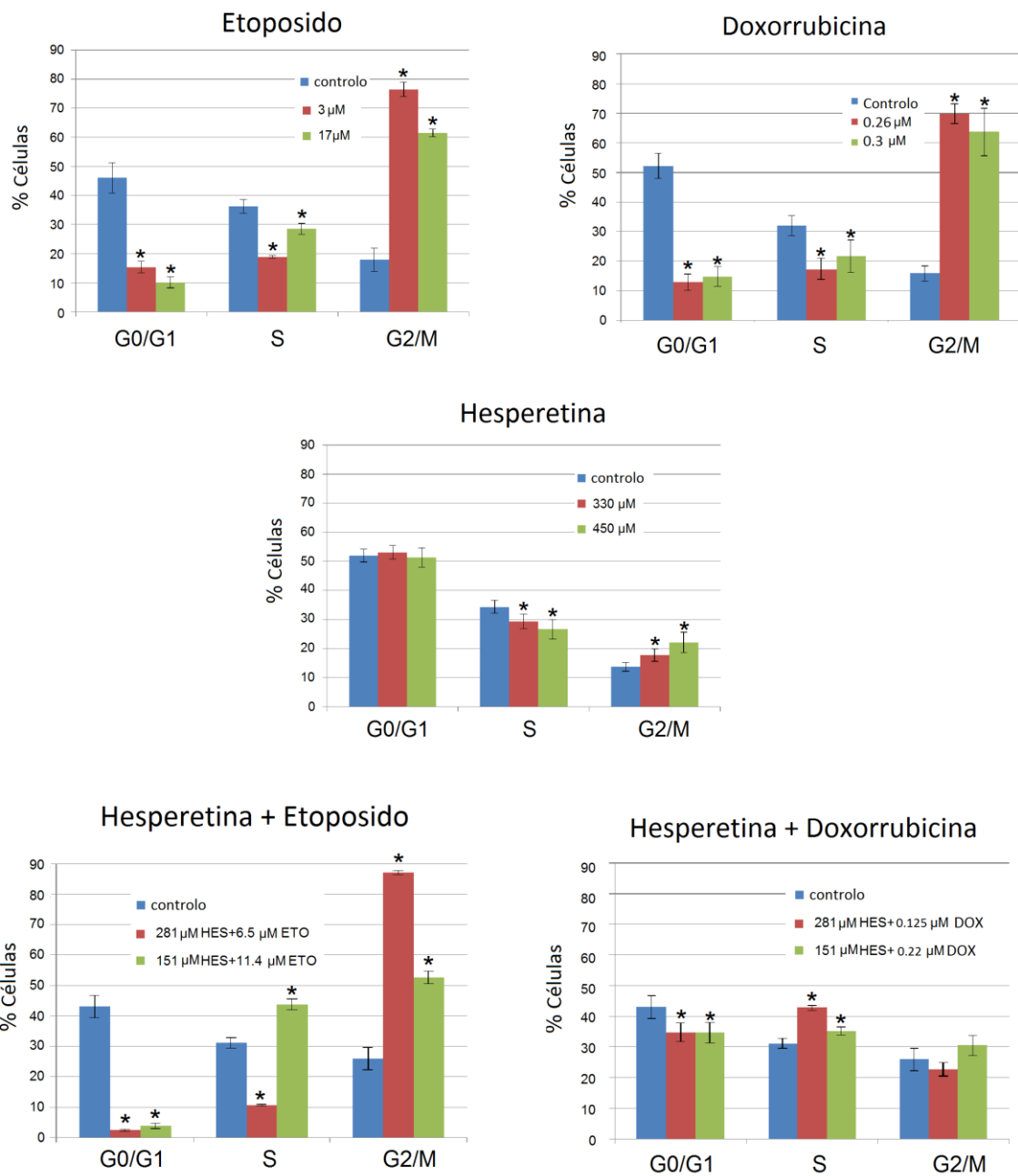


Figura 14. Percentagem de células existentes nas diferentes fases do ciclo celular quando expostas a diferentes compostos. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (n=3)

4.4) Efeitos genotóxicos e citotóxicos

As concentrações de hesperetina apresentaram o NDI suficientemente elevado para a validação do ensaio de micronúcleos por bloqueio de citocinese. Para as concentrações de etoposido, doxorubicina e combinações o NDI foi

inferior a 1,2 o que não permitiu validar este parâmetro face ao número reduzido de células BN (ver figura 15).

O mesmo ensaio foi realizado para as combinações de hesperetina/doxorubicina, mas não foram obtidos resultados, pois observaram-se predominantemente restos de células mortas (ver anexo 6).

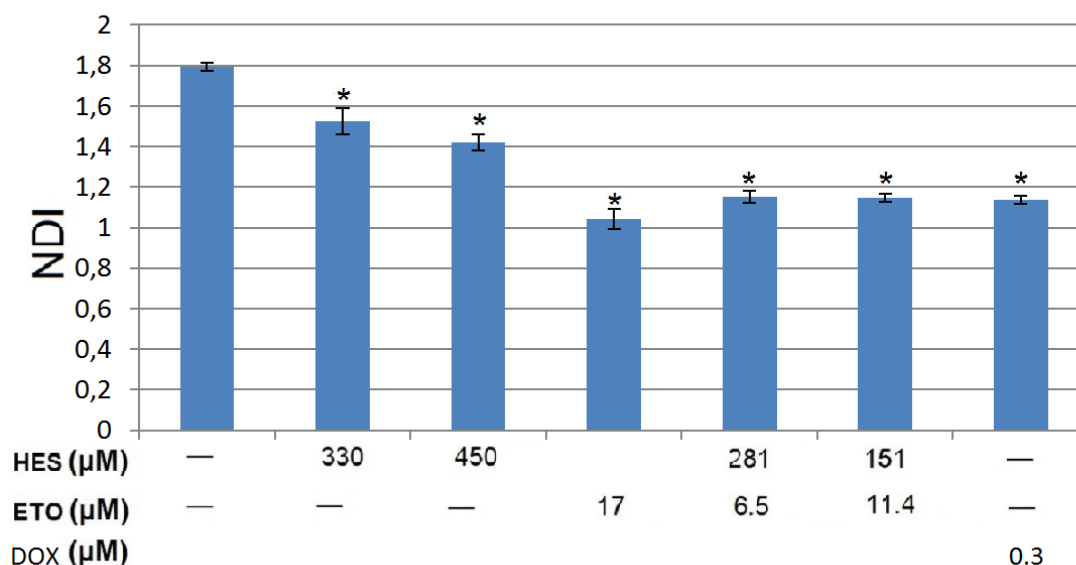


Figura 15. Índice de divisão nuclear para os diferentes compostos e suas combinações. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). HES: hesperetina; ETO: etoposido; DOX: doxorubicina.

Após a contagem dos diferentes tipos de células para o composto hesperetina obtiveram-se os resultados de frequência de células multinucleadas e diferentes parâmetros:

Tabela 3. Contagem de células de acordo com o número de núcleos. A contagem aleatória contabilizou pelo menos 1000 células binucleadas. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$)

	Controlo	HES 330 µM	HES 450 µM
Mononucleadas	313 \pm 53,1	1096 \pm 245,4*	1487 \pm 216,9*
Binucleadas	1001 \pm 2,3	1000 \pm 0	1001 \pm 2,9
Trinucleadas	13 \pm 7,0	32 \pm 16,4	38 \pm 15,4
Tetranucleadas	6 \pm 1,5	11 \pm 9,4	10 \pm 4,9

Tabela 4. Frequência de diferentes tipos de anomalias nucleares por cada 1000 células binucleadas. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$)

	Controlo	HES 330 μM	HES 450 μM
Micronúcleos	0	25 \pm 20	18 \pm 14,9
Pontes nucleoplásmicas	0,3 \pm 0,6	0	0,2 \pm 0,4

Visualizaram-se ao microscópio de fluorescência diferentes tipos de células e alguns danos provocados no ADN para o composto de hesperetina.

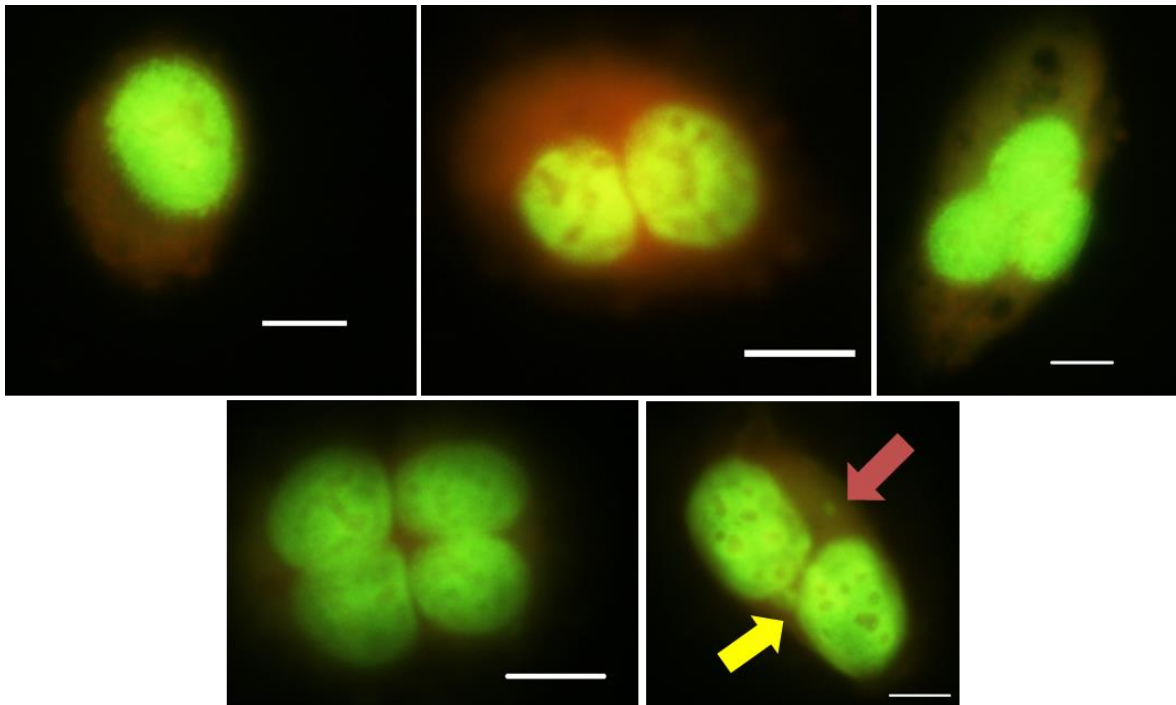


Figura 16. Células mono, bi, tri e tetranucleadas e respectivos danos do ADN, micronúcleo e ponte nucleoplásmica visualizados ao microscópio de fluorescência (da esquerda para a direita). Barra de escala 10 μm . \rightarrow MNI; \rightarrow NPB

5) Discussão

Atualmente os quimioterápicos são o tratamento mais utilizado para metástases tumorais. No entanto, a capacidade que as células cancerígenas têm de se tornarem simultaneamente resistentes a diferentes fármacos - quimiorresistência múltipla – continua a ser um obstáculo à quimioterapia bem sucedida. Três décadas de pesquisa à resistência de múltiplos fármacos identificaram várias formas de as células contornarem os efeitos induzidos por fármacos, sendo evidente que a resistência existe contra todos os fármacos eficazes, incluindo os mais recentes. Desenvolver novos compostos ou novas combinações, que reduzam a resistência das células aos fármacos, continua a ser uma necessidade constante de forma a ajudar na melhoria da quimioterapia (Gottesman, M, Fojo, T, e Bates, S, 2002). Assim, neste trabalho as combinações desenvolvidas contemplam dois dos fármacos mais utilizados na quimioterapia de osteossarcoma (etoposido e doxorrubicina) e um fitocomposto (hesperetina), com vista a detetar sinergismos de ação citotóxica.

As propriedades antioxidantes dos flavonóides têm a capacidade de a baixas concentrações prevenir a carcinogénese. Têm maior ou menor seletividade na morte de células tumorais, dependendo do tipo de flavonóide e da linha celular em questão.

Para o ensaio clonogénico foram utilizadas concentrações mais baixas quando comparadas com as concentrações utilizadas em outros ensaios, pois este ensaio em particular foi feito em condições diferentes dos outros, com baixa densidade de células semeadas e tempo de exposição longo sem reposição de meio. Os resultados obtidos demonstram que em geral, o aumento de concentração de hesperetina diminui a formação de colónias. Assim para concentrações relativamente baixas, entre 0 μM e 100 μM existe a capacidade de formação de colónias que indica uma recuperação celular com um valor significativo. Enquanto que, para concentrações mais elevadas testadas, exemplo: 200 μM as células tiveram uma inibição significativa na capacidade de formação de colónias (figura 6). O valor de formação de colónias para o controlo foi de 35,25%, um valor

relativamente baixo quando se esperava um valor mais elevado, perto dos 100%, tendo em conta que o tempo de duplicação é de aproximadamente 20 horas. Este valor poderá ter sido baixo devido à exclusão dos agregados de células maiores e menores a 50 células. Não tendo sido avaliado com outras concentrações e testado para densidades celulares inferiores.

A base genética molecular da sensibilidade versus resistência à terapia do cancro é complexa e envolve muitos processos, nomeadamente o metabolismo e transporte de substâncias ativas, reparação do ADN e apoptose (Blower, P, et al, 2008). Muitos tratamentos utilizados no combate ao cancro não apresentam qualquer resposta uma vez que as células têm adquirido resistência aos fármacos.

Antes da realização do estudo dados preliminares indicaram que baixas concentração não afetaram negativamente a viabilidade celular por esse motivo foram utilizadas concentrações mais altas do que se refere na maioria dos estudos. A relativa insensibilidade a baixas concentrações de hesperetina poderá ser explicada por características da linha celular utilizada, pois apresenta a Rb e a p53 funcionais (Niforou, K et al, 2008), uma vez que em outras linhas celulares cancerígenas a p53 se encontra mutada ou não se encontra presente (Yu, R et al, 2000; Hollstein, M et al, 1994). A proliferação celular foi testada com o ensaio de MTT e CV. Comparando os dois tipos de ensaios de proliferação celular observaram-se diferenças nas respostas das células, a taxa de crescimento celular foi inibida em maior percentagem comparando com o metabolismo celular de redução de substratos (figuras 8 e 9). Para o ensaio de MTT, só a partir de concentrações elevadas é que ocorre uma diminuição da viabilidade para a hesperetina o que não se verifica em outros estudos realizados com outro tipo de células (Choi, E e Kim, Y 2008; Pollard, S, Whiteman, M e Spencer, J, 2006; Rainey-Smith, S et al, 2008). A diminuição da viabilidade ocorre a partir de 350 μ M (figura 9), sendo a partir desta concentração que a função mitocondrial é afetada alterando a função de desidrogenase mitocondrial, impedindo a clivagem dos anéis de tetrazólio do MTT responsável pela formação de cristais de formazano de cor roxa (Buch, K et al, 2012; Fotakis, G e Timbrell, J, 2006). Para

concentrações inferiores (125 μM) ocorre um efeito contrário, havendo um aumento da viabilidade celular. Assim se verificou que este fitocomposto causa um efeito dependente da droga com um IC50 de 653 μM . Da mesma forma Alshatwi et al. (Alshatwi, A, Ramesh, E e Periasamy, V, 2013) referem que o tratamento com hesperetina inibe a viabilidade das células SiHa tendo obtido resultados semelhantes.

Os ICs utilizados para o ciclo celular e para as combinações foram o IC25 e o IC50 pois, para ICs mais elevados as células já tinham sofrido muitas alterações. Para cálculo de IC25 e IC50 utilizaram-se resultados de MTT e não de CV porque estas eram em média mais elevadas de forma a testar uma maior amplitude de concentrações nos ensaios com combinações.

A regulação do ciclo celular e a apoptose são cruciais para a homeostasia entre a divisão celular e morte celular (Hengartner, M, 2000). A aperiocidade do ciclo celular é uma das características das células tumorais. Quando as células que contêm ADN danificado entram em mitose, o checkpoint de G2/M ajuda a prevenir a progressão do ciclo celular, tentando reparar o ADN que foi danificado (Lee, D et al, 2012). Como se pode visualizar na figura 14, a hesperetina induz a fase G2/M enquanto diminui a fase S. Vários estudos demonstram que o complexo Ciclina B/ Cdc2 (CDK1) é determinante na passagem da fase G2 para a fase M, o complexo é fosforilado por resíduos da CDK1. Estas fosforilações inibidoras são executadas por cinases. A ativação é executada por membros da família de fosfatases Cdc25 que removem essas fosforilações inibidoras. Após esta desfosforilação, o complexo CDK/ciclina B está finalmente ativo e a mitose inicia-se. A diminuição da expressão da ciclina B1, Cdc2 e Cdc25c pode ser um mecanismo molecular através do qual a hesperetina atrasou a fase G2 / M (Lee et al. 2012; Perdigão, J e Tavares, A).

As concentrações utilizadas para o ciclo celular e para a hesperetina, numa grande parte da literatura são muito inferiores às utilizadas, um dos exemplos é, Choi, E, 2007; Jin, Y, et al, 2008, mas, aplicado a outros tipos de cancro, em que induzia a fase G0/G1 do ciclo celular. Mais recentemente Alshatwi, A et al.

(Alshatwi, A, et al, 2013), usaram concentrações idênticas para o mesmo composto mas para cancro do colo do útero, obtendo uma indução na fase G2/M do ciclo celular, tal como se obteve para a linha celular U2OS.

Os dados obtidos por ensaio de MTT apontam para efeitos citotóxicos na mesma gama de concentrações em que se verificam alterações no ciclo celular (figura 14), relativamente à hesperetina, ou seja, é necessário uma elevada concentração do fitocomposto para que haja alguma alteração significativa nas fases do ciclo celular.

Na figura 15 pode-se observar que o NDI para a hesperetina em relação ao controlo vai diminuindo com o aumento das concentrações (330 μ M-1,52; 450 μ M-1,42), existindo menos divisões nucleares (Fenech, M 2007), sendo concordante com os dados da tabela 3 em que existem mais células mononucleadas. Um aumento de células binucleadas é um indicador de uma maior taxa de divisão celular (Cavas, T, Garanko, N e Arkhipchuk, V, 2005), o menor NDI verificado para células expostas a hesperetina sugere que o fitocomposto tem efeitos citostáticos nestas células. Os dados obtidos por ensaio de ciclo celular apontam para um atraso de fase G2/M o que poderá ser responsável pela diminuição do NDI observada (figura 15). Uma possível explicação para a reduzida divisão nuclear poderá ser a diminuição da expressão da ciclina B1, Cdc2 e Cdc25c referida anteriormente em que o fitocomposto induz um aumento da fase G2/M, não entrando em mitose e não efectuando assim a divisão. Quanto ao número de MNi, NPBs e NBUDs registou-se um ligeiro aumento para a hesperetina mas não significativo (tabela 4). Esta observação sugere que a hesperetina não induziu efeitos genotóxicos nas condições testadas. A apoptose e a necrose não foram avaliadas uma vez que ambas são muito idênticas.

Dadas as concentrações de hesperetina utilizadas serem tão elevadas, este composto deveria sofrer alterações na sua composição de maneira a que as concentrações utilizadas para esta linha celular fossem inferiores.

Wittle, U et al (Wittke, U, Schenker, T, Luedke, G e Stahel, R, 2009) é um dos autores que apoia os dados obtidos no ensaio de MTT e CV para a doxorrubicina

e etoposido, ou seja, à medida que se vai aumentando a concentração do composto a proliferação celular vai diminuindo, apesar de serem para linhas celulares diferentes (SW2; NCI-N47; NCI- H82; NCI- H69). Alguns autores, como Sert, V, et al. (Sert, V, et al, 1999) também verificaram que o etoposido induz a fase G2/M do ciclo celular. Neste estudo verificou-se que ao serem utilizadas concentrações dos IC5 e IC25 se obteve perfis de doxorrubicina e etoposido muito idênticos para o ciclo celular, validando os ICs calculados e o facto de os mecanismos de ação não serem muito diferentes. Estes dois compostos são dos mais utilizados no combate ao osteossarcoma, por isso se encontram bastante estudados (Evdokiou, A et al, 2002).

Para uma redução da concentração dos agentes antineoplásicos, decidiu-se fazer combinações com hesperetina.

Relativamente aos resultados obtidos para a capacidade de formação de colónias confirmam que os agentes antineoplásicos utilizados (em concentrações de IC5 e IC25) têm efeitos fortemente inibidores da formação de colónias nas células U2OS. A adição de hesperetina não contrariou esse efeito, uma vez que não foram observadas colónias também nas combinações com hesperetina.

Nos ensaios de combinação foram utilizadas concentrações inibidoras esperadas de 25%, presumindo um efeito aditivo. Contudo o efeito inibidor foi superior a 40% ou 50%, dependendo da combinação, o que indica sinergismo (figura 10). Verificou-se também que a concentração mais sinérgica era a que apresentava uma menor concentração de etoposido, sendo uma observação importante no contexto da terapêutica, pois uma dose de concentração mais baixa administrada poderá diminuir a quimiorresistência adquirida pelas células e a quimiotoxicidade para o organismo. O IC50 das combinações de hesperetina/etoposido relativamente à inibição de crescimento (ensaio de CV) é mais baixo quando comparado com a inibição da atividade metabólica (ensaio de MTT). Há uma maior inibição do crescimento celular do que da viabilidade celular por exposição a esta combinação nesta linha celular. A combinação mais sinérgica para diminuição do crescimento celular (281 μ M hesperetina+6,5 μ M etoposido, ensaio de CV) foi a que apresentou também maiores alterações na

distribuição das fases do ciclo celular. Para esta combinação verifica-se que há uma diminuição na fase G0/G1 e um aumento na fase G2/M. A combinação altera significativamente o ciclo celular. As células U2OS, que têm elevada proliferação, quando expostas à combinação poderão sofrer alterações nas taxas de proliferação celular resultantes de alteração do ciclo celular. Para a combinação de 151 μ M hesperetina+11,4 μ M etoposido a percentagem de células em fase G2/M é menor (52,5%), a fase S para esta combinação é mais elevada (43,7%) e a percentagem de células em fase G0/G1 (3,8%) é muito inferior ao controlo.

Na figura 15, pode-se visualizar que o NDI obtido para os compostos, etoposido, doxorrubicina e combinações com hesperetina, foi inferior a 1,2, não sendo assim possível contabilizar os diferentes tipos de células e as alterações ocorridas. Não obstante os dados obtidos através da contagem do NDI sugerem um efeito citostático, compatível com um aumento da fase G2/M do ciclo celular (figura 14). Quanto aos resultados das combinações hesperetina/doxorrubicina não foi possível calcular o NDI pois não foram visualizadas células intactas (anexo 5).

Relativamente ao efeito das combinações no crescimento celular (ensaio de CV) conclui-se que as combinações testadas com doxorrubicina tiveram maior eficácia (inibição de cerca de 40%) relativamente ao efeito aditivo esperado de IC25. Após análise da viabilidade celular, observaram-se efeitos opostos entre baixas e altas concentrações de hesperetina. A baixas concentrações, a hesperetina induziu um aumento de viabilidade celular. O mesmo se verificou em combinações a concentrações teóricas aditivas de 25% de inibição (hesperetina/etoposido e hesperetina/doxorrubicina). Quando se utilizaram combinações a concentrações teóricas de 50% de inibição (hesperetina/etoposido), verificou-se diminuição de viabilidade comparativamente ao controlo, contudo as combinações originaram viabilidade superior a 50%, o que seria esperado por efeito de aditividade, isto é, sem sinergismo nem antagonismo. Comparando os resultados obtidos para as combinações de hesperetina/doxorrubicina (ensaio de CV) não se verificou diferenças muito significativas, os valores obtidos são muito próximos, seria necessário realizar-se

mais ensaios. Já para as mesmas concentrações mas para o ensaio de MTT estas apresentam um maior antagonismo.

Relativamente ao efeito das combinações no ciclo celular, a combinação de 151 μM hesperetina+0,22 μM doxorubicina provoca uma diminuição da percentagem de células em fase G0/G1 e um aumento em S. Em G2/M não são evidentes grandes alterações. Uma das hipóteses para o aumento destas fases poderá ser a inibição das CDKs que controlam o ciclo celular, quando as estas se encontram inativas não há formação do complexo ativo ciclina/CDK, impedindo que a célula avance para a fase seguinte do ciclo celular (Park, M e Lee, S, 2003). Esta hipótese poderá ser testada futuramente. Para estas concentrações, o etoposido e a doxorubicina têm a capacidade de intervirem na inibição de diferentes CDKs em ambas as fases: para a fase S a CDK interveniente é CDK2, para a fase G2 é a CDK1 (Collins, I e Garrett, M, 2005). Estes agentes antineoplásicos também podem intervir na formação do complexo ciclina/CDK e na inativação das ciclinas. De acordo com Szulawska, A et al (Szulawska, A et al, 2013) 650 μM de hesperetina induziram a subexpressão de CDK2 na linha celular SiHa. Uma hipótese para explicar as alterações do ciclo celular observadas neste trabalho seria que um aumento da hesperetina e uma diminuição da doxorubicina apenas afeta a CDK2 interveniente na fase S do ciclo celular.

Para o ciclo celular, seria interessante verificar os efeitos para o IC50, mas para estudos genotóxicos não ocorreriam grandes aberrações cromossómicas.

6) Conclusão e perspectivas futuras

As escolhas para o tratamento do osteossarcoma são poucas e a quimiorresistência por parte das células aos fármacos vai aumentando, não sendo possível aplicar a mesma forma de tratamento a todos os doentes. Para tal novas abordagens terapêuticas deverão ser desenvolvidas.

Neste estudo observou-se que a flavonona hesperetina induziu um atraso na fase G2/M, uma diminuição do crescimento celular e impediu que ocorresse formação de colónias a concentrações elevadas tanto individualmente como em combinação, contudo algumas combinações não apresentaram resultados tão evidentes.

As limitações observadas apontam claramente para a necessidade de realização de estudos adicionais tais como estudos de dano no ADN através do ensaio de cometas, análise do potencial transmembrana mitocondrial e estudos com outras linhas celulares para que se possa fazer uma comparação entre diferentes linhas celulares.

Conjugando diferentes abordagens de terapias espera-se que a terapia do osteossarcoma possa tornar-se mais eficaz, apresentando menos riscos ou efeitos secundários nefastos para os pacientes

7) Referências bibliográficas

- Alshatwi, A, Ramesh, E e Periasamy, V, "The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways," *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 27, no. 6, pp. 581–92, 2013.
- Aranganathan, S, e Nalini, N, "Efficacy of the Potential Chemopreventive Agent, Hesperetin (citrus Flavanone), on 1,2-Dimethylhydrazine Induced Colon Carcinogenesis." *Food and chemical toxicology*, vol. 47, no. 10, pp. 2594–2600, 2009.
- Barlogie, B, Raber, M, Schumman, J, et al, "Flow Cytometry in Clinical Cancer," *Cancer Research*, vol. 43, pp. 3982–97, 1983.
- Beecher, G, "Overview of Dietary Flavonoids : Nomenclature , Occurrence and Intake," *The journal of nutrition*, vol. 133, no. 10, pp. 3248–54. 2003.
- Bernas, T, Grégori, G, Asem, E e Robinson, J, "Integrating Cytomics and Proteomics," *Molecular & cellular proteomics*, vol. 5 no. 1, pp. 2–13, 2006.
- Blower, P, Chung, J, Verducci, J, et al, "MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells," *American Association for Cancer Research*, vol. 7, no. 1, 2008.
- Bromberg, K, Burgin, A e Osheroff, N, "A Two-Drug Model for Etoposide Action against Human Topoisomerase II α ," *The Journal of biological chemistry*, vol.278, no. 9, pp. 7406–12, 2003.
- Brown, M, e Wittwer, C, "Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology," *Clinical chemistry*, vol. 46, no. 8, pp. 1221–29, 2000.
- Buch, K, Peters, T, Nawroth, T, Sanger, M, Schmidberger, H e Langguth, P, "Determination of Cell Survival after Irradiation via Clonogenic Assay versus Multiple MTT Assay--a Comparative Study," *Radiation oncology*, vol. 7, no. 1, 2012.
- Cavas, T, Garanko, N, e Arkhipchuk, V, "Induction of Micronuclei and Binuclei in Blood, Gill and Liver Cells of Fishes Subchronically Exposed to Cadmium Chloride and Copper Sulphate," *Food and chemical toxicology*, vol. 43, no. 4, pp. 569–74, 2005.
- Chiba, K, Kawakami, K e Tohyama, K, "Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells," *Toxicology in vitro*, vol. 12, no. 3, pp. 251–58, 1998.
- Choi, E, "Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK 4 and p21," *Nutrition cancer*, vol. 59, no. 1, 2007.
- Choi, E e Kim, Y, "Hesperetin Attenuates the Highly Reducing Sugar-Triggered Inhibition of Osteoblast Differentiation," *Cell biology and toxicology*, vol. 24, no. 3, pp. 225–31, 2008.

- Collins, I e Garrett, M, "Targeting the Cell Division Cycle in Cancer: CDK and Cell Cycle Checkpoint Kinase Inhibitors," *Current opinion in pharmacology*, vol. 5, no. 4 pp. 366–73, 2005.
- Dhawan, A, Kayani, M, Pany, J, Pany, E e Anderson, D, "Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes," *Oxford Journals*, vol. 18, no. 6, pp. 487-90, 2004.
- Diller, L, Kassel, J, Nelson, C, Gryka, M, Litwak, G, Gebhardt, M, Bressac, B, Ozturk, M, Baker, S, e Vogelstein, B, "p53 Functions Cell Cycle Control Protein in Osteosarcomas," *Molecular and Cell Biology*, vol. 10, no. 11, 1990.
- Eastmond, D e Tucker, J, "Identification of Aneuploidy–inducing Agents Using Cytokinesis–blocked Human Lymphocytes and an Antikinetochores Antibody," *Environmental Molecular Mutagenesis*, vol. 13, no. 1, pp. 34–43, 1989.
- Eckford, P e Sharom, F, "ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs," *Chemical reviews*, vol. 109, no. 7, pp. 2989–3011, 2009.
- Erlund, I, Silaste, M, Alfthan, G, Rantala, M, Kesaniemi, Y e Aro, A, "Plasma Concentrations of the Flavonoids Hesperetin, Naringenin and Quercetin in Human Subjects Following Their Habitual Diets, and Diets High or Low in Fruit and Vegetables," *European journal of clinical nutrition*, vol. 56, no. 9, pp. 891–98, 2002.
- Erlund, I, Meririnne, E, Alfthan, G e Aro, A, "Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice," *The Journal of Nutrition*, vol. 131, no. 2, pp. 235–41, 2001.
- Evdokiou, A, Bouralexis, S, Atkins, G, Chai, F, Hay, S, Clayer, M e Findlay, D, "Chemotherapeutic Agents Sensitize Osteogenic Sarcoma Cells, but Not Normal Human Bone Cells, to Apo2L/TRAIL-Induced Apoptosis," *International journal of cancer*, vol. 99, no. 4, pp. 491–504, 2002.
- Fenech, M, "Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay," *Nature protocols*, vol. 2, no. 5, pp. 1084–1104, 2007.
- Ferlay, J, Soerjomataram, I, Ervik, M, Dikshit, R, Eser, S, Mathers, C, Rebelo, M, Parkin, D, Forman D e Bray, F, "Cancer Incidence and Mortality Worldwide", 2012. [Online]. Available: <http://globocan.iarc.fr>. [consultado em 25-Ago-2014].
- Fotakis, G e Timbrell, J, "In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride," *Toxicology letters*, vol. 160, no. 2, pp. 171–77, 2006.
- Franken, N, Rodermond, H, Stap, J, Haveman, J e Bree, C, "Clonogenic Assay of Cells in Vitro," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 5, pp. 2315–19, 2006.
- Garg, A, Garg, S, Zaneveld, L e Singla, A, "Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin," *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 8, pp. 655–69, 2001.

- Gerlier, D e Thomasset, N, "Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation," *Journal of Immunological Methods*, vol. 94, no. 1–2, pp. 57–63, 1986.
- Gil-Izquierdo, A, Gil, M, Ferreres, F e Tomás-Barberán, F, "In Vitro Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 49, no. 2, pp. 1035–41, 2001.
- Gottesman, M, Fojo, T e Bates, S, "Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters." *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 48–58, 2002.
- Gurjal, A, An, T, Valdivieso, M e Kalemkerian, G, "Etoposide-Induced Pulmonary Toxicity," *Lung Cancer*, vol. 26, no. 2, pp. 109–12, 1999.
- Heiden, M, "Targeting Cancer Metabolism: A Therapeutic Window Opens," *Nature reviews*, vol. 10, no. 9, pp. 671–84, 2011.
- Hengartner, M, "The Biochemistry of Apoptosis," *Nature*, vol. 407, pp. 770–76, 2000.
- Hollstein, M, Rice, K, Greenblatt, M, Soussi, T, Fuchs, R, Sorlie, T, Hovig, E, Sorensen, B, Montesano, R e Harris, C, "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines," *Oxford University*, vol. 22, no. 17, pp. 3551–55, 1994.
- Ishiyama, M, Tominaga, H, Shiga, M, Sasamoto, K, Ohkura, Y e Ueno, K, "A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neural Red and Crystal Violet," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 19, no. 11, pp. 1518–20, 1996.
- Jantas, D e Lason, W, "Protective Effect of Memantine against Doxorubicin Toxicity in Primary Neuronal Cell Cultures: Influence a Development Stage," *Neurotoxicity research*, vol. 15, no. 1, pp. 24–37, 2009.
- Jemal, A, Bray, F e Ferlay, J, "Global Cancer Statistics," *A Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 61, no. 2, pp. 69–90, 2011.
- Jin, Y, Han, X, Zhang, Y, Lee, J, Kim, Y, Kim, T, Yoo, H e Yun, Y, "Hesperetin, a bioflavonoid, inhibits rat aortic vascular smooth muscle cells proliferation by arresting cell cycle," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, no. 1, 2008
- Khanna, C, Fan, T, Gorlick, R, et al, "Toward a Drug Development Path That Targets Metastatic Progression in Osteosarcoma," *Clinical cancer research*, vol. 20, no. 16, pp. 4200–4209, 2014.
- Lee, D, Park, K, Park, H, Kang, S, Nagappan, A, Kim, J, Kim, E, Lee, W, Hah, Y, Chung, H, An, S e Kim, G, "Flavonoids Isolated from Korea Citrus Aurantium L. Induce G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Human Gastric Cancer AGS Cells," *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012.
- Lentini A, Forni C, Provenzano B, Beninati S. Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin and hesperitin correlate to reduction of the in vivo metastatic potential. *Amino Acids*. 2007; 32:95–100

- Leonard, R, Williams, S, Tulpule, A, Levine, A e Oliveros, S, "Improving the Therapeutic Index of Anthracycline Chemotherapy: Focus on Liposomal Doxorubicin (Myocet)," *The Breast*, vol. 18, no. 4, pp. 218–24, 2009.
- Loddo, M, Kingsbury, S, Rashid, M, Proctor, I, Holt, C, Young, J, Sheikh, S, Falzon, M, Eward, K, Prevost, T, Sainsbury, R, Stoeber, K e Williams, G, "Cell-Cycle-Phase Progression Analysis Identifies Unique Phenotypes of Major Prognostic and Predictive Significance in Breast Cancer," *British journal of cancer*, vol. 100, no. 6, pp. 959–70, 2009.
- Longhi, A, Errani, C, Paolis, M, Mercuri, M e Bacci, G, "Primary Bone Osteosarcoma in the Pediatric Age: State of the Art," *Cancer treatment reviews*, vol. 32, no. 6, pp. 423–36, 2006.
- Marina, N, Gebhardt, M, Teot, L e Gorlick, R, "Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma," *The Oncologist*, vol. 9, no. 4, pp. 422–41, 2004.
- Middleton, E, Kandaswami, C e Theoharides, T, "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation , Heart Disease and cancer," *Pharmacological Reviews*, vol. 52, no. 4, pp. 673–751, 2000.
- Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, "Osteosarcoma Incidence and Survival Rates from 1973 to 2004," *Cancer*, vol. 115, no. 7, pp. 1531–43, 2009.
- Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, "International Osteosarcoma Incidence Patterns in Children and Adolescents, Middle Ages and Elderly Persons," *International journal of cancer*, vol. 125, no. 1, pp. 229–34, 2009a
- Mirabello, L, Troisi, R e Savage, S, "International Osteosarcoma Incidence Patterns in Children and Adolescents, Middle Ages, and Elderly Persons," *International Journal of Cancer*, vol. 125, no. 1, pp. 229–34, 2009b.
- Mishra, P, Shaal, L, Müller, R e Keck, "Production and Characterization of Hesperetin Nanosuspensions for Dermal Delivery," *International journal of pharmaceutics*, vol. 371, no. 1-2, pp. 182–89, 2009.
- Nagarajan, R, Kamruzzaman, A, Ness, K, Marchese, V, Sklar, C, Mertens, A, Yasui, Y, Robinson, L e Marina, N, "twenty years of follow-Up of Survivors Childhood osteosarcoma: A report from the childhood cancer Survivor Study (CCSS)," *National institutes of health*, vol. 117, no. 3, pp. 625–34, 2012.
- Neuhouser, M, "Review : Dietary Flavonoids and Cancer Risk : Evidence From Human Population," *Nutrition and cancer*, vol. 50, no. 1, pp. 1-7, 2009.
- Niforou, K, Anagnostopoulos, A, Vougas, K, Kittas, C, Gorgoulis, V e Tsangaris, G, "The Proteome Profile of the Human Osteosarcoma U2OS Cell Line," *Cancer genomics & proteomics*, vol. 5, no. 1, pp. 63–78, 2008.
- Nijveldt, R, Nood, E, Hoorn, D, Boelens, P, Norren, K e Leeuwen, P, "Flavonoids : A Review of Probable Mechanisms of Action and," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 74, no. 4, pp. 418–25, 2001.

- Nitiss, J, "Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy," *Nature reviews. Cancer*, vol. 9, no. 5, pp. 338–50, 2009.
- Ottaviani, G e Jaffe, N, "The Epidemiology of Osteosarcoma," *Cancer Treatment and Research*, vol. 152, pp. 3-13, 2010.
- Pautke, C, Schieker, M, Tischer, T, Kolk, A, Neth, P, Mutschler, W e Milz, S, "Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63 , Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts." *Anticancer Research*, vol. 24, pp. 3743–48, 2004.
- Perdigão, J e Tavares, A, "Ciclo Celular E Novas Terapias Contra O Cancro (O Ano Do Nobel)," *Boletim de Biotecnologia*, pp. 7–14.
- Pollard, S, Whiteman, M e Spencer, J, "Modulation of Peroxynitrite-Induced Fibroblast Injury by Hesperetin: A Role for Intracellular Scavenging and Modulation of ERK Signalling," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 347, no. 4, pp. 916–23, 2006.
- Rainey-Smith, S, Schroetke, L, Bahia, P, Fahmi, A, Skilton, R, Spencer, J, Evans, C, Rattray, M e Williams, R, "Neuroprotective Effects of Hesperetin in Mouse Primary Neurones Are Independent of CREB Activation," *Neuroscience letters*, vol. 438, no. 1, pp. 29–33, 2008.
- Sert, V, Cans, C, Tasca, C, Bennis, L, Oswald, E, Ducommun, B e Rycke, S, "the bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks," *Oncogene*, vol. 18, no. 46, pp. 6296-04, 1999.
- Siclari, V e Qin, L, "Targeting the Osteosarcoma Cancer Stem Cell," *Journal of orthopaedic surgery and research*, vol. 5, no. 1, pp. 78, 2010.
- Szulawska,A, e Czyz, M, "Molecular Mechanisms of Anthracyclines Action." *Postepy Hig Med Dosw*, vol.60, pp. 78–100, 2006.
- Ta, H, Dass, C, Choong, P e Dunstan, D, "Osteosarcoma Treatment: State of the Art," *Cancer metastasis reviews*, vol. 28, no. 1-2, pp. 247–63, 2009.
- Takemura, G e Fujiwara, H, "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy from the Cardiotoxic Mechanisms to Management," *Progress in cardiovascular diseases*, vol. 49, no. 5, pp. 330–52, 2007.
- Trieb, K, Lehnert, R, Stulnigt, T, Sulzbachers, I e Shroyert, K, "Survivin Expression in Human Osteosarcoma Is a Marker for Survival," *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 29, no. 4, pp. 379–82, 2003.
- Vermeulen, K, Bockstaele, D e Berneman, Z, "The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer," *Cell Proliferation*, vol. 36, no. 3, pp. 131–49,2003.
- Wittke, U, Schenker, T, Luedke, G e Stahel, R, "Synergistic Cytotoxicity of Bcl-2 Antisense Oligodeoxynucleotides and Etoposide , Doxorubicin and Cisplatin on Small-Cell Lung Cancer Cell Lines," *British Journal of cancer*, vol. 78, no. 1998, pp. 1035–42, 2009.

Yu, R, Heaney, P, Lu, W, Chen, J e Melmed, S, "Pituitary Tumor Transforming Gene Causes Aneuploidy and p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 47, pp. 36502–5, 2000.

Zarebczan, B, Pinchot, S, Kunnimalaiyaan, M e Chen, H, "Hesperetin, a Potential Therapy for Carcinoid Cancer," *American journal of surgery*, vol. 201, no. 3, pp. 329–32, 2011.

Zhang, S, Yang, X e Morris, M, "Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport," *Molecular pharmacology*, vol. 65, no. 5, 2004.

ANEXOS

Anexo 1

Cultura celular

De forma a manter a integridade da linha celular e das condições experimentais, empregaram-se técnicas de cultura celular estritamente assépticas.

A linha de osteossarcoma humano U2OS foi propagada e cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 2mM L-glutamina, 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e 2.5 µg/ml de fungizona. Para descongelar as células, adicionou-se 8 ml de meio DMEM completo a 37 °C a frascos de 75 cm² de área superficial de fundo. As células foram descongeladas rapidamente, em banho-maria e adicionadas lentamente ao meio. Após 24 horas verificou-se a adesão das células ao frasco por microscopia, e substituiu-se o meio. A propagação foi realizada em incubadora a 37 °C e em atmosfera com 5% de CO₂.

Para tripsinização, usaram-se células U2OS com confluência entre 90 e 100%. Para isso o meio foi removido e as células em frasco de 75 cm² foram lavadas com 5 ml de PBS, seguidamente adicionou-se cerca de 3 ml de tripsina-EDTA a 0,25% aos frascos durante 5 minutos de modo a que as células se desagregassem. Para ter a certeza que as células estavam destacadas, observaram-se ao microscópio ótico (MO) invertido. Em seguida, adicionaram-se, 6 ml de meio novo ao frasco de tripsina de modo a inativar a tripsina.

Por fim, foi colocado num novo frasco aproximadamente 2 ml do conteúdo do frasco, perfazendo-se o volume com meio de cultura, aproximadamente 8 ml. O meio de cultura foi renovado 2 vezes por semana.

Anexo 2

Protocolo otimizado ensaio clonogénico

Este ensaio sofreu algumas alterações: o protocolo inicial (Rafehi et al. 2011) utilizava placas de 15 mm mas neste ensaio foram utilizadas placas de 6 poços, o protocolo inicial, primeiro expõe as células e em seguida eram semeadas, este método foi realizado mas após as células serem semeadas em meio fresco, tiveram uma maior recuperação apresentando a placa muito confluenta. Então as células foram semeadas e depois expostas aos compostos.

A densidade celular utilizada foi ajustada à dimensão dos poços, (50 células/poço). As células foram tripsinizadas e inativadas com meio de cultura e em seguida, semeadas (2 ml/ poço) e foram colocadas na incubadora durante 18 horas. Após incubação, removeu-se o meio de cultura e substituiu-se por igual volume do composto com diferentes concentrações e incubou-se durante 48 horas. Após exposição observou-se ao microscópio ótico invertido, removeu-se o meio de cultura, lavou-se com 2 ml de PBS e tratou-se com 300 µl de tripsina. Em seguida inativou-se com 600 µl de meio de cultura e contou-se na câmara de Neubauer as células. Semeou-se uma nova placa de 6 poços 50 células/poço de maneira a que no final a placa tivesse entre 20 a 150 colónias. Incubou-se durante 2 semanas. Após a incubação, o meio das células foi retirado, foram lavadas com 2 ml de PBS e adicionou-se 1 ml da solução de violeta de cristal (0,2% de violeta de cristal com 10% de etanol), durante 30 minutos, estas concentrações foram adaptadas de alguns artigos, sendo a que melhores resultados apresentava e em menos tempo. O protocolo inicial, utilizava formalina, a 10% durante 30 minutos para fixar e em seguida utilizava violeta de cristal a 0.01% para corar entre 30 a 60 minutos. Por fim, lavou-se o excesso de violeta de cristal com água destilada e deixou-se sacar durante a noite. A contagem das colónias e das células em cada colónia foi feita com a ajuda do microscópio ótico invertido. O protocolo inicial sugeria utilizar o programa Fiji Version 1.44^a para fazer a contagem das colónias.

Anexo 3

Protocolo otimizado CV

Este ensaio sofreu algumas alterações, pois os artigos que utilizaram este método usaram placas de 96 poços, neste ensaio foram utilizadas placas de 24 poços, pois com as placas de 96 poços não se obtiveram resultados.

A densidade celular utilizada foi ajustada à dimensão dos poços, (2×10^5 células/poço). As células foram semeadas e incubadas pelo menos 16 horas a 37 °C, 5% de CO₂ para as células aderirem. Após o tempo de incubação, verificou-se ao microscópio ótico invertido se as células se encontravam aderidas. Retirou-se o meio de cultura, adicionou-se 600 µl dos vários compostos a testar e colocou-se na incubadora durante 48 horas. Após exposição, o meio das células foi retirado, foram lavadas com PBS e adicionou-se 600 µl da solução de violeta de cristal (0,2% de violeta de cristal com 10% de etanol), durante 30 minutos, estas concentrações foram adaptadas de alguns artigos, sendo a que melhores resultados apresentava e em menos tempo. Outros artigos utilizavam formalina, a 10% durante 30 minutos para fixar e em seguida utilizava violeta de cristal a 0.01% para corar entre 30 a 60 minutos. Ao fim dos 30 minutos, retirou-se o violeta de cristal, lavou-se com água destilada e adicionou-se 600 µl da solução de 1% de SDS durante 60 minutos com a placa em agitação. Por fim fez-se a leitura das absorvâncias da solução a 570 nm em espectrofotômetro

Anexo 4

Isobologramas dos respectivos ICs

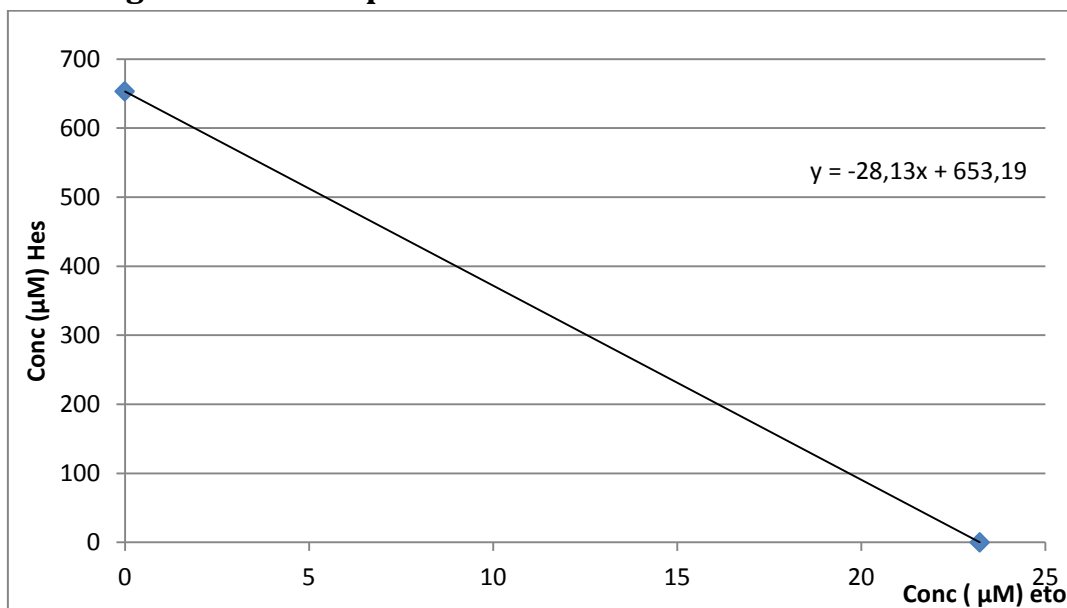


Figura 17. Isoblograma do IC50 da hesperetina/etoposido. Os Ics obtidos foram obtidos através dos modelos Brain Cousens e Cedergreen-Ritz-Stribig

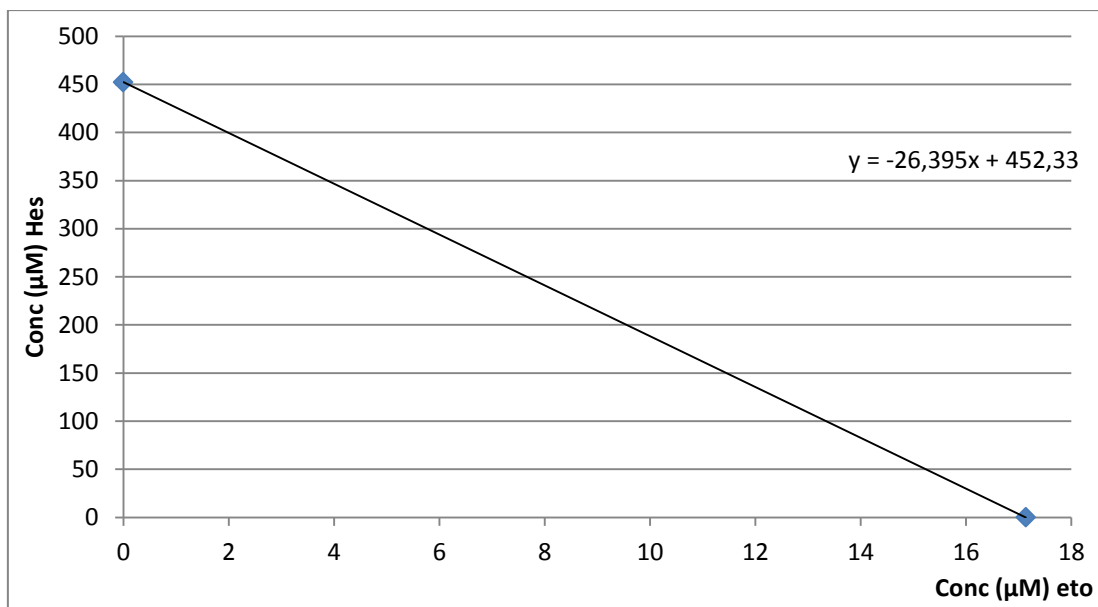


Figura 18. Isoblograma do IC25 da hesperetina/etoposido. Os Ics obtidos foram obtidos através dos modelos Brain Cousens e Cedergreen-Ritz-Stribig

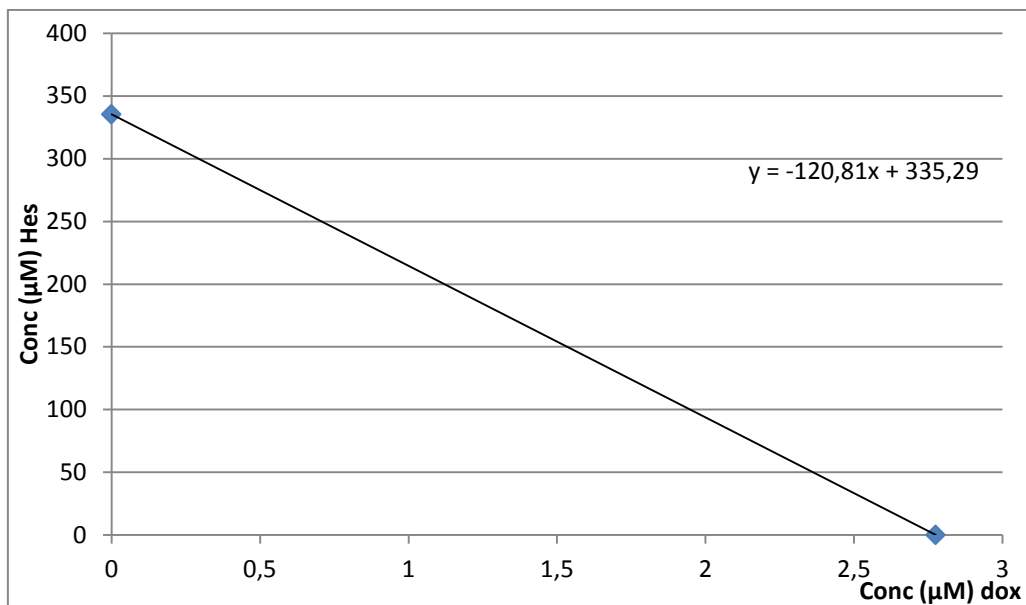


Figura 19. Isoblograma do IC25 da hesperetina/doxorubicina. Os Ics obtidos foram obtidos através dos modelos Brain Cousens e Cedergreen-Ritz-Stribig

Anexo 5

Imagens ao microscópio óptico do ensaio de CV

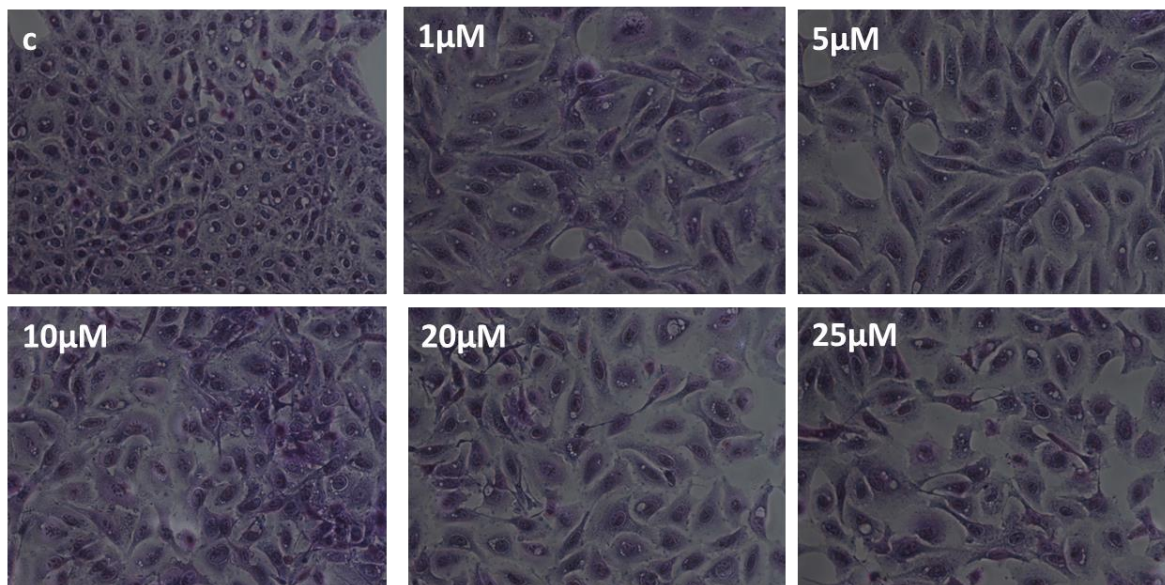


Figura 20. Imagens das diferentes concentrações de etoposídeo

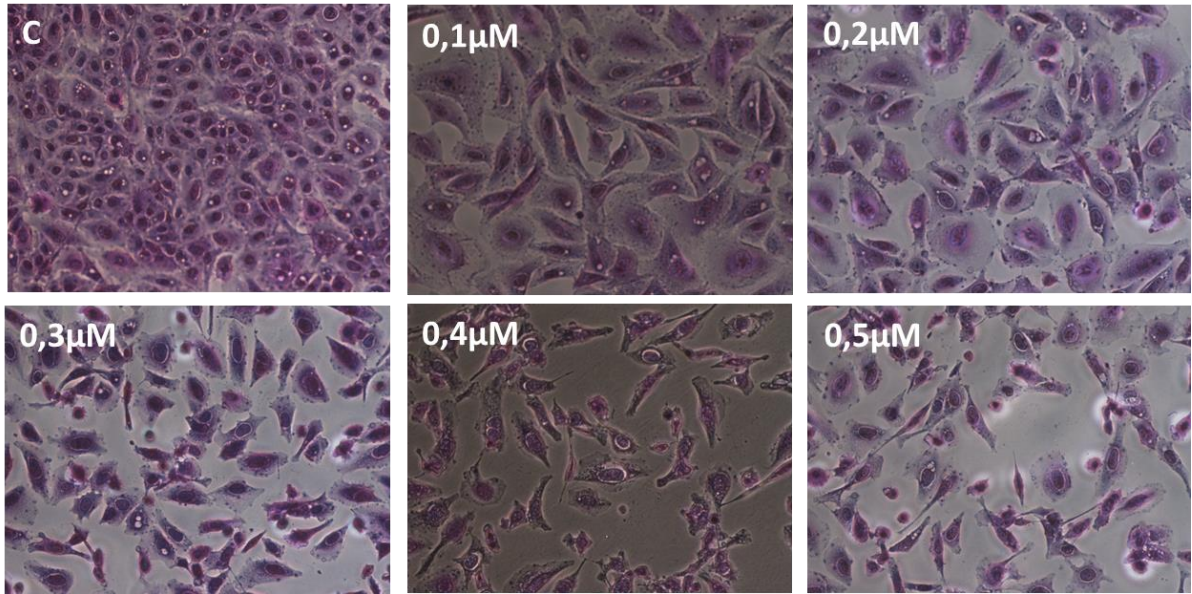


Figura 21. Imagens das diferentes concentrações de doxorubicina

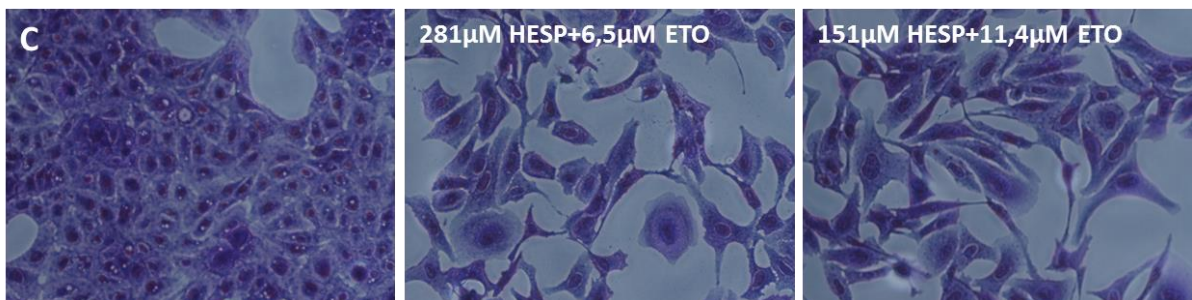


Figura 22. Imagens das diferentes combinações de hesperetina/etoposido referentes ao IC25

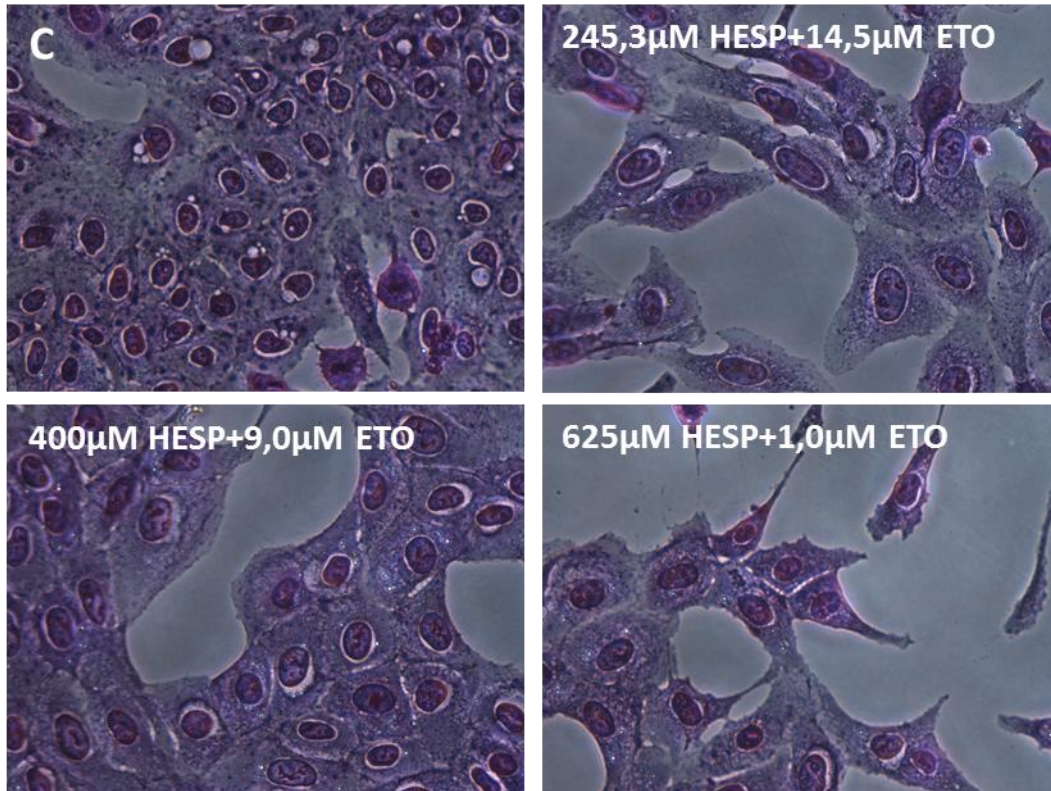


Figura 23. Imagens das diferentes combinações de hesperetina/etoposido referentes ao IC50

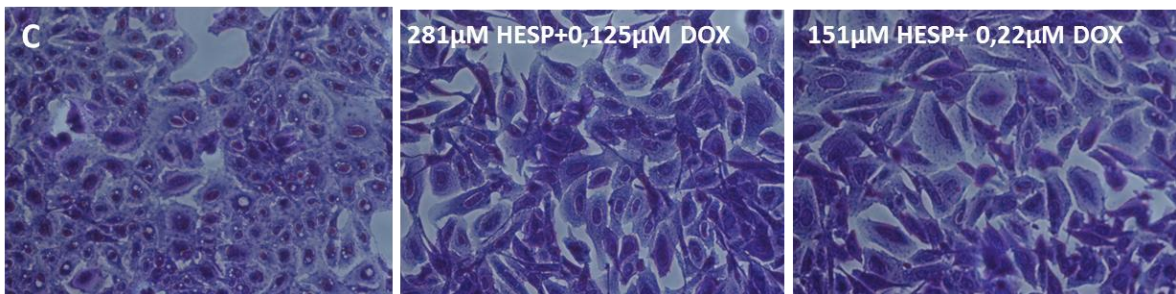


Figura 24. Imagens das diferentes combinações de hesperetina/doxorrubicina referentes ao IC25

Anexo 6

Imagens ao microscópio de fluorescência do ensaio de CBMN

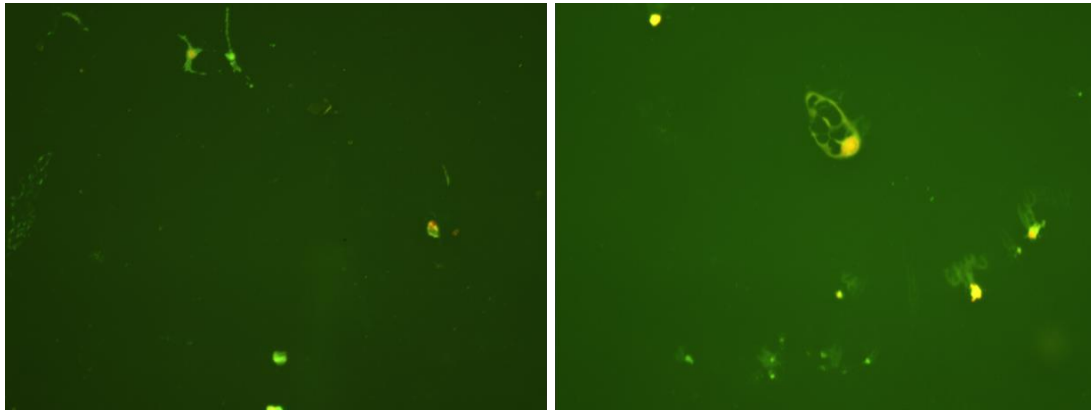


Figura 25. Imagens das combinações de hesperetina/doxorubicina ao microscópio de fluorescência