

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Verônica Farina Azzolin

A INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL (HT-29): ESTUDO *IN VITRO*.

Santa Maria, RS
2016

Verônica Farina Azzolin

**A INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO- PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL
(HT-29): ESTUDO *IN VITRO*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Área de
Concentração em Farmacologia dos Processos
Oxidativos, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em
Farmacologia**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Farina Azzolin, Verônica
A INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL (HT-29): ESTUDO IN VITRO. / Verônica Farina Azzolin.-2016.
68 p.; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânicia da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Desbalanço superóxido peróxido de hidrogênio; 2. Câncer Colorretal I. Mânicia da Cruz , Ivana Beatrice II. Título.

Verônica Farina Azzolin

**A INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO- PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL
(HT-29): ESTUDO *IN VITRO*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Área de
Concentração em Farmacologia dos Processos
Oxidativos, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em
Farmacologia**

Aprovado em 16 de fevereiro de 2016:

Ivana Beatrice Mânicca da Cruz, Dr^a. (UFSM)
(Orientadora)

Liliane de Freitas Bauermann,
Dr^a. (UFSM)

Claudia Giuliano Bica, Dr^a. (UFCSPA)

Santa Maria, RS

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me conceder sabedoria e persistência nas minhas escolhas.

Aos meus pais, Valdenir e Geneci, agradeço do fundo do meu coração, por sempre me apoiarem e incentivarem minhas escolhas, nunca deixando eu desistir e por eu ter chegado até aqui. Agradeço pelo amor e o carinho sempre comigo e agradeço muito também pela paciência. Obrigada por serem esses pais sempre presentes em todos os momentos. Amo vocês.

Agradeço também a minha segunda mãe que é a Zana, pois sem ela jamais eu estaria aqui. Ela sempre me ajudando com tudo e sempre ao meu lado dando todo o suporte e ajuda necessários. Nos momentos de aperto e solidão chamava a Zana e ela sempre pronta estava lá, todo o incentivo para que jamais eu desissesse. Te Amo Zana.

À Vitória, minha irmã, que sempre esteve presente nessa trajetória, sempre ouvindo minhas apresentações antes de qualquer aula ou palestra, nos momentos de alegria e também nos de choro e desespero sempre dizendo “mana não chora vai dar tudo certo”. Pelo amor, companheirismo, compreensão e também acima de tudo paciência. Mana Te Amo.

À minha querida Profª Mara Fantinel, pois se não fosse ela não teria chegado ao Laboratório Biogenômica e à Profª Ivana. Por todos os ensinamentos durante a graduação e também na vida. Pela confiança que depositou em mim ao me indicar à Profª Ivana. Meu Eterno Muito Obrigada.

À minha orientadora e também mãe científica Profª. Drª Ivana Beatrice Manica da Cruz pela oportunidade e confiança depositada, e por tudo que fizeste por mim. É difícil achar palavras para lhe agradecer a tamanha gratidão e acima de tudo admiração e carinho que tenho pela senhora. Obrigada por sempre nos receber de braços abertos e permitir a realização de um grande sonho. A senhora é um exemplo de profissional e a tamanha admiração por essa sabedoria é o que nós inspira. Meu Eterno Muito Obrigada. E sempre terás minha eterna admiração, gratidão e respeito.

À minha amiga Fernanda Barbisan, pelas ajudas e amizade e por sempre estar ao meu lado me aguentando e também pela tamanha paciência. Meu Muito Obrigada. Torço muito por ti, pois sei do teu potencial e irás muito longe. E sempre poderás contar comigo.

Aos colegas e amigos Alencar Machado e Francine Cadoná por toda ajuda em todas as horas nas noites, finais de semana e por todos os ensinamentos, pela tamanha amizade e companheirismo, e por nossos dias que além do trabalho nos renderam muitas risadas e histórias para contar. Vocês são pessoas muito queridas as quais sempre vão estar guardadas no meu coração e pensamento. Muito Obrigada.

Às minhas colegas e amigas, Maiquidieli Dal Berto e Dianni Capeleto, pela ajuda, acima de tudo pelas conversas e incentivos. Sempre na hora em que precisava de conselhos estavam sempre dispostas a ajudar à Maqui mesmo longe sempre estava pronta. Meu Muito Obrigada. E podem sempre contar comigo.

E a todos os colegas e amigos do Laboratório de Biogenômica pelo companheirismo e coleguismo. Admiro cada um de vocês em suas trajetórias. Meu muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelos recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Meu muito Obrigada.

À banca, pela disponibilidade. Muito Obrigada.

E a todos os familiares e amigos que de uma forma ou de outra sempre estiveram comigo, pois sozinho não somos nada.

Obrigada a todos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

A INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO- PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL (HT-29): ESTUDO *IN VITRO*.

AUTOR: Verônica Farina Azzolin

ORIENTADORA: Profª. Drª. Ivana Beatrice Mânicia da Cruz

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 16 de fevereiro 2016.

Introdução: a superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), é uma importante enzima antioxidante, que dismuta o ânion superóxido produzido na mitocôndria em peróxido de hidrogênio, que por sua vez é catalisado pela glutationa peroxidase (GPX) em água e oxigênio. Apesar de ser crucial para a célula saudável, o papel da SOD2 no câncer é bastante controverso, pois em alguns tipos de neoplasias apresenta uma clara ação antitumoral, enquanto que em outras tem um papel pró tumoral. Investigações prévias envolvendo um polimorfismo no códon 16 do gene da SOD2 no qual ocorre uma troca de uma valina por uma alanina (Val16Ala-SOD2), têm associado maior eficiência da enzima SOD2 com risco elevado de alguns tipos de câncer. Entretanto, em certos tipos de tumores, como o câncer colorretal os resultados são conflitantes. Estudos sugerem que os níveis elevados de SOD2 em células de tumores colorretais estão associados com a progressão do tumor. Possivelmente esta dificuldade em definir o papel da SOD2 na biologia do câncer colorretal esteja vinculado a grande influência de fatores ambientais sobre o sistema gastrointestinal, com destaque a dieta. Por este motivo, o desenvolvimento de um modelo farmacológico de desbalanço para investigar o papel do desbalanço ânion superóxido-peróxido de hidrogênio (*Superoxide Anion Hydrogen Peroxide imbalance, AS-HP*) no câncer colorretal pode ser considerado relevante. **Objetivo:** investigar o efeito *in vitro* do desbalanço farmacológico do AS-HP causado pela exposição ao paraquat e a porfirina na viabilidade e taxa proliferativa da linhagem comercial de células de câncer colorretal (HT-29) e na resposta destas células ao quimioterápico oxaliplatina. O estudo também avaliou o efeito do desbalanço AS-HP na modulação da expressão de genes apoptóticos, do ciclo celular e oxidativos nas células HT-29. **Métodos.** Células HT-29 obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivadas em meio DMEM, 10% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos e antifúngicos em estufa com CO₂ a 5% e temperatura de 37°C. Após 24 h da transferência das células para placas de 96 poços na concentração de 10⁵ células por poço, estas foram expostas a concentração de 0,1 uM de paraquat, que é uma molécula geradora de superóxido, ou de porfirina, que é uma molécula com efeito similar a enzima SOD2. Parte das células foi tratada com oxaliplatina na concentração de 20uM e outra não. O efeito na viabilidade, proliferação celular, ciclo celular, apoptose, e na modulação dos genes do ciclo celular, apoptose e metabolismo oxidativo (β -actina, SOD1, SOD2, CAT, GPX, Caspase 3, Caspase 8, BAX, BCL-2 e P53) também foram avaliados. Os ensaios foram realizados em triplicatas e comparados por análise de variância de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey. **Resultados:** o desbalanço farmacológico AS-HP obtido via exposição das células de câncer colorretal ao paraquat e porfirina alterou o padrão de viabilidade, ciclo celular e na modulação da expressão gênica. Tanto o paraquat quanto a porfirina na concentração 0,1 uM diminuíram a viabilidade e a taxa de proliferação das células HT-29. No entanto, este efeito foi mais pronunciado em células expostas ao paraquat. A ação da oxaliplatina foi potencializada pela presença do paraquat quando foram analisadas a taxa de mortalidade, apoptose, taxa de proliferação celular. O paraquat também induziu interrupção do ciclo celular nas fases S e G2 / M. Tanto o paraquat quanto a porfirina foram capazes de modular diferencialmente marcadores do metabolismo oxidativo e a expressão dos genes investigados. Entretanto, os resultados foram bastante heterogêneos. Esta heterogeneidade pode estar relacionada com a instabilidade cromossômica de células tumorais que apresentam níveis mutacionais altos e variados. **Conclusão:** os resultados

obtidos corroboram a hipótese de que o desbalanço AS-HP age sobre a biologia do câncer colorretal, e que em especial o aumento nos níveis de superóxido, não só aumentam a taxa de mortalidade mas também inibem a proliferação celular, potencializando assim, a ação antitumoral da oxaliplatina. Estes resultados podem ser clinicamente relevantes na construção de estratégias farmacológicas e/ou nutricionais, como um adjuvante ao tratamento o uso de vitaminas ou outros suplementos dietéticos, que atuem no balanço AS-HP e que auxiliem no sucesso do tratamento quimioterápico da doença.

Palavras Chave: Superóxido. Peróxido de Hidrogênio. Câncer Colorretal. Superóxido dismutase.

ABSTRACT
Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

**THE INFLUENCE UNBALANCE SUPEROXIDE HYDROGEN PEROXIDE IN
RESPONSE TO CHEMOTHERAPY CANCER CELLS COLORECTAL (HT-29):
STUDY IN VITRO.**

Author: Verônica Farina Azzolin

Advisor: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânicia da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, February 16, 2016.

Introduction: manganese dependent superoxide dismutase (SOD2), is an important antioxidant enzyme, superoxide dismutase to anion produced in mitochondria in hydrogen peroxide, which in turn is catalyzed by glutathione peroxidase (GPX) into water and oxygen. Although be crucial for healthy cell, the role of SOD2 in cancer is highly controversial because in some kinds of cancers this enzyme exhibits a marked antitumor activity, while in others have a pro-tumor role. Previous investigations involving a polymorphism in codon 16 of SOD2 gene in which there is an exchange of a valine with an alanine (Val16Ala-SOD2) have associated increased efficiency of enzyme SOD2 at high risk of some cancers. However, in certain types of tumors, such as colorectal cancer are conflicting results. Studies suggest that high levels in tumor cells SOD2 colorectal cancers are associated with tumor progression. Perhaps this difficulty in defining the role of SOD2 in colorectal cancer biology is linked to great influence of environmental factors on the gastrointestinal system, especially the diet. For this reason, the development of an unbalance pharmacological model to investigate the role of superoxide-anion imbalance hydrogen peroxide (Superoxide Anion Hydrogen Peroxide imbalance, AS-HP) in colorectal cancer may be relevant. **Objective:** This study investigated the in vitro effect of drug-AS-HP imbalance caused by exposure to paraquat and the porphyrin in the viability and proliferative rate of commercial line of colorectal cancer cells (HT-29) and the response of these cells to chemotherapy oxaliplatin. The study also assessed the effect of AS-HP unbalance in the modulation of the expression of apoptotic genes, cell cycle and oxidative in HT-29 cells. **Methods.** HT-29 obtained from American Type Cell Culture Collection (ATCC) were grown in DMEM, 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic and antifungal in an oven with 5% CO₂ and 37 ° C temperature. After 24 h the transfer of cells to 96-well plates at a concentration of 10⁵ cells per well were exposed to these concentrations of 0.1 uM paraquat which is a superoxide-generating molecule or porphyrin which is a molecule with a similar effect SOD2 enzyme. Part of the cells was treated with oxaliplatin at a concentration of 20um and the other not. The effect on the viability, cell proliferation, cell cycle, apoptosis and modulation of genes of the cell cycle, apoptosis and oxidative metabolism (SOD1, SOD2, CAT, GPX, Caspase 3, Caspase 8, BAX, BCL-2 and P53colocar the name gene) was also evaluated. Assays were done in triplicate and compared by analysis of variance followed via test post hoc Tukey. **Results:** pharmacological imbalance AS-HP obtained via exposure of colorectal cancer cells to paraquat and porphyrin changed the standard of viability, cell cycle and in the modulation of gene expression. Both paraquat as nna porphyrin concentration 0.1 uM reduced the viability and proliferation rate of HT-29 cells. However, this effect was more pronounced in cells exposed to paraquat. The action of oxaliplatin was enhanced by the presence of paraquat when analyzed, the mortality rate, apoptosis, cell proliferation rate. Paraquat tamém induced cell cycle interruption phases S and G2 / M Any paraquat as porphyrin were able to modulate differentially markers of oxidative metabolism and expression of genes investigated. However, the results were quite heterogeneous. This heterogeneity may be associated with chromosomal instability in cancer cells that have high

levels, and varied mutational. **Conclusion:** The results confirm the hypothesis that the AS-HP unbalance acts on the biology of colorectal cancer, and in particular increased levels of superoxide, not only increase the mortality rate but also inhibit cell proliferation enhancing so antitumor action of oxaliplatin. These results may be clinically relevant in the construction of pharmaceutical and / or nutritional strategies as the use of vitamins and other dietary supplements which operate in AS-HP sheet and to assist in the successful chemotherapeutic treatment of disease.

Key-words: Superoxide. Hydrogen peroxide. Colorectal cancer. Superoxide dismutase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS-HP Superóxido- peróxido de hidrogênio
HT-29- Células de linhagem comercial de câncer colorretal
SOD2- Superóxido dismutase dependente de manganês
DNA- Ácido desoxirribonucleico
OMS- Organização Mundial da Saude
CEA- Antígeno carcino-embriônário
US- Ultrassonografia
TC- Tomografia Computadorizada
Tx- Tumor primário inacessível
T0- Sem evidência de tumor primário
T1- Tumor invadindo submucosa
T2- Tumor invadindo muscular própria
T3- Tumor invadindo subserosa ou tecidos pericólicos ou perirretais
T4- Tumor invadindo diretamente outros órgãos
Nx- Linfonodos regionais inacessíveis
N0- Sem evidência de linfonodos regionais
N1- Metástase em até 3 linfonodos
N2- Metástase em 4 ou mais linfonodos
N3- Metástase em qualquer linfonodo ao longo da cadeia
Mx- Presença de metástase à distância não pode ser observada
M0- Sem metástase à distância
M1- Metástase a distância
TSOF- Pesquisa de sangue oculto nas fezes
CCR- Câncer Colorretal
ERO- Espécie Reativa de Oxigênio
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
 O_2^- - Ânion Superóxido
 H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio
 OH° - Radical hidroxila
 Fe^{++} - Ferro
 Cu^+ - Cobre
LDL- Lipoproteína de baixa densidade
Zn- Zinco
CAT- Catalase
SOD- Superóxido dismutase
GPX- Glutatona peroxidase
AA- Alanina Alanina
VV- Valina Valina
AV- Alanina Valina
CCR T-84- Linhagem comercial de células de câncer colorretal
TFD- Terapia Fotodinâmica
 ON° - Óxido Nítrico
ERN- Espécie Reativa de Nitrogênio
SNP- Polimorfismo de nucleotídeo único
DU-145- Células de linhagem comercial de câncer de próstata

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Bases biológicas do câncer	10
1.2 Epidemiologia do Câncer	11
1.2.1 Epidemiologia do adenocarcinoma colorretal	12
1.3 Intestino grosso, cólon e o adenocarcinoma colorretal	12
1.4 Etiologia e fatores de risco do câncer colorretal.....	14
1.5 Sintomatologia	14
1.6 Estadiamento da doença	15
1.7 Diagnóstico	16
1.8 Tratamento.....	17
1.9 Papel do metabolismo oxidativo no câncer colorretal	18
1.9. 1 Espécies Reativas de Oxigênio	18
1.9.2 Defesas antioxidantes.....	19
1.9.3 Superóxido Dismutase e Câncer.....	20
1.10 O modelo do desbalanço AS-HP	23
1.11 Paraquat	25
1.12 Porfirina.....	26
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	29
4 DISCUSSÃO	53
5 CONCLUSÃO	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bases biológicas do câncer

O câncer é uma doença resultante de alterações genéticas que são capazes de modificar a constituição química do DNA. Geralmente, os genes atingidos estão relacionados aos processos de indução e controle do ciclo de divisão celular e/ou a um desequilíbrio no controle da morte celular programada (FERREIRA & ROCHA, 2004).

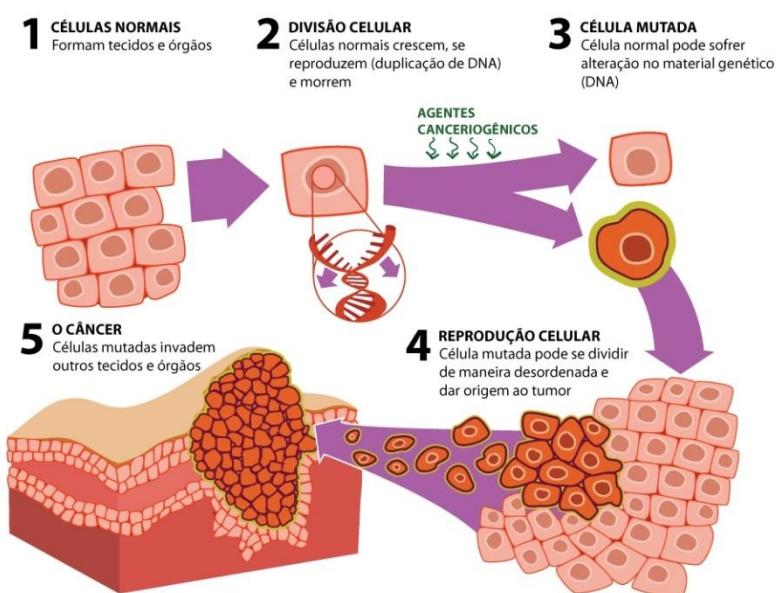


Figura 1: Mostra as fases do crescimento do tumor.
Fonte: Adaptada de García, 2005.

No crescimento celular, há um aumento da massa celular, duplicação do DNA e, finalmente, a divisão da célula em duas idênticas. O ciclo mitótico ocorre através das seguintes fases: G1, S, G2, M e G0 (BRASIL, 2003). O controle deste crescimento celular parece estar na dependência de fatores estimulantes e inibidores. Normalmente, o crescimento celular encontra-se em equilíbrio, até que haja o surgimento de um estímulo de crescimento efetivo, sem ativação do mecanismo inibidor (ALBERTS et al., 2004).

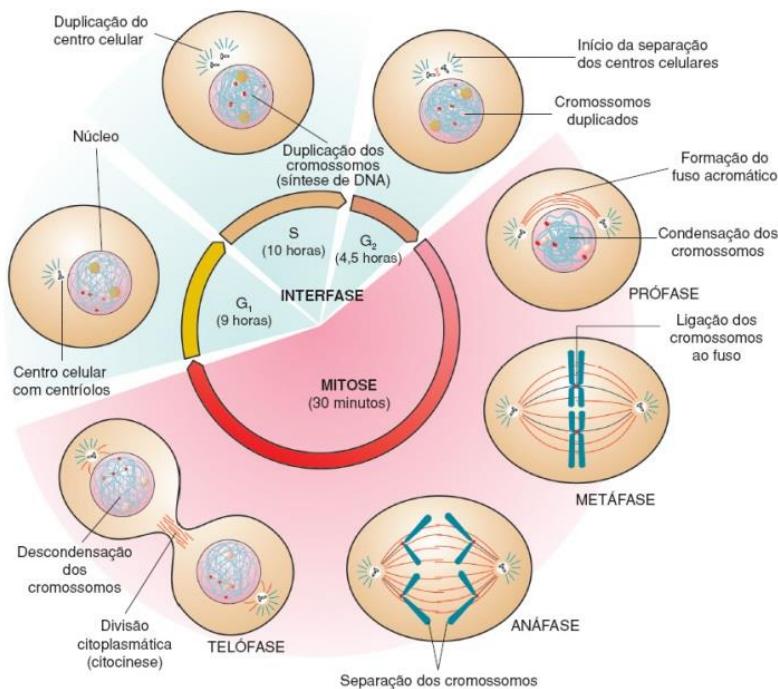


Figura 2: Mostrando as fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptada de García, 2005.

O câncer é conhecido como uma doença crônica não-transmissível, cujo crescimento desordenado de células invade tecidos e órgãos, que se dividem rapidamente. Estas células tendem a ser agressivas e de crescimento incontrolável, determinando a formação de tumores malignos com potencial para desenvolver metástases em diferentes órgãos do corpo (HERR et al., 2012; FRIEDENREICH, 2001).

1.2 Epidemiologia do Câncer

As doenças oncológicas atualmente são consideradas um grave problema para a população pela elevada incidência, prevalência, mortalidade, gastos hospitalares e, acima de tudo, as consequências sobre a qualidade de vida do paciente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que houveram 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A elevada prevalência do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas.

Dados epidemiológicos demonstram que os tipos de câncer mais frequentes na população mundial, em homens, foram próstata, pulmão e cólon e reto; e entre as mulheres, mama, cólon e reto e pulmão. Nos países em desenvolvimento, as três neoplasias malignas mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e em mulheres, mama, colo do útero e pulmão (INCA, 2013).

Há uma previsão de que em 2030, a incidência de novos casos de câncer seja de 21,4 milhões e de mortes por câncer 13,2 milhões de pessoas. Este aumento na prevalência do câncer deve ocorrer em consequência do envelhecimento da população devido à redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infectocontagiosas (INCA, 2013).

1.2.1 Epidemiologia do câncer colorretal

Entre os diversos tipos de câncer, tem-se o adenocarcinoma colorretal. Na estimativa epidemiológica mundial mais recente, estima-se que em 2016, o Brasil terá 16.660 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,66 novos casos a cada 100 mil homens e 17,62 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Como está ocorrendo um crescimento no número de indivíduos afetados por câncer colorretal, existe a necessidade de identificação de fatores de risco e de fatores que incidem sobre a evolução da doença e na resposta terapêutica a quimioterápicos (HERR et al, 2012). Por este motivo, investigações sobre alterações metabólicas que podem atuar diminuindo a agressividade deste tumor e aumentando a sua suscetibilidade à terapia farmacológica são relevantes.

1.3 Intestino grosso, cólon e o câncer colorretal

O intestino grosso, cuja principal função é a absorção de água e eletrólitos, possui cerca de 1,5m de comprimento, apresentando-se fixo na sua quase totalidade e emoldurando o intestino delgado. É formado pelo cólon, que é situado no abdômen, e pelo reto e ânus, localizados na pelve e períneo (CAMPOS & HABR, 1994).

O cólon é dividido em segmentos segundo suas características. Sua porção inicial, a mais dilatada, é chamada de ceco e é onde se encontra o apêndice vermiforme. Subindo junto à parede abdominal direita, em direção ao fígado, encontra-se o segmento chamado de cólon ascendente. Depois o intestino grosso atravessa o abdômen até a parede abdominal esquerda, junto ao baço, com o nome de cólon transverso. A partir daí, desce até a parte inferior esquerda, sendo chamado de cólon descendente. As junções entre o cólon ascendente e transverso e entre este e o descendente são chamadas de flexuras hepática e esplênica, respectivamente. Após o cólon descendente, o intestino grosso torna-se solto e em forma de “S”, recebendo o nome de sigmoide (CAMPOS & HABR, 1994).

Os últimos 15 cm do trato digestivo, logo após o sigmoide, são chamados de reto, sendo subdividido em três partes: o reto superior, médio e inferior. A porção distal do reto é afunilada e conhecida como ânus, sendo a linha de transição designada de linha pectínea. É envolvido por um sistema muscular esfincteriano que tem como principal função a continência de gases e fezes (CAMPOS & HABR, 1994).

Em particular, o câncer colorretal desenvolve-se através de vários estágios. O primeiro estágio é caracterizado pela hiperplasia, resultante de mutações nos genes responsáveis pelo reparo do DNA e, em alguns casos, por uma hiperproliferação incontrolável de células nas criptas do cólon. Adicionalmente, mutações nos genes que controlam o ciclo celular podem ocorrer e levar a uma expansão de clones neoplásicos a partir das células das criptas intestinais. Rapidamente, a neoplasia intraepitelial espalha-se para vários locais da mucosa do cólon, dando origem aos pólipos adenomatosos, os quais permanecem, ainda nesta fase, pré-invasivos ou pré-malignos. Contudo, estas células podem se tornar invasivas ao atingirem a membrana basal do epitélio e se expandir para outros tecidos (ROYNETTE et al., 2004).

Portanto, o desenvolvimento da neoplasia do cólon segue uma progressão clara, atribuída à transformação do epitélio normal da mucosa do cólon a pólipos adenomatosos e, por último, ao câncer invasivo (PALOZZA et al., 2009; SERVEI CATALÀ DE LA SALUT, 2000). A sequência adenoma-câncer representa a contrapartida morfológica da carcinogênese por múltiplos passos dirigidos por alterações genéticas. O adenoma ou pólio adenomatoso tem papel

fundamental no desenvolvimento do câncer, sendo reconhecido como sua única lesão precursora (BRASIL, 2003).

1.4 Etiologia e fatores de Risco do Câncer Colorretal

O desenvolvimento de várias formas comuns de câncer é resultado da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo um dos mais notáveis a dieta. Para o câncer de cólon e reto, os fatores protetores mais importantes são a atividade física e o consumo de alimentos que contêm fibras dietéticas, ou seja, aqueles de origem vegetal, tais como: frutas, hortaliças (legumes e verduras) e cereais integrais. Por outro lado, são fatores de risco para esse tipo de câncer: carne vermelha, carnes processadas (como mortadelas, presuntos, salsichas, linguiças), bebidas alcoólicas, tabagismo, gordura corporal e abdominal (DASHWOOD, 1999; PETERS et al., 2003; MATHEW et al., 2004). Outros fatores de risco são a história familiar de câncer colorretal, infecções bacterianas, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam com a idade. Apesar disso, a maioria dos cânceres de cólon e reto (cerca de 75%) se dão de forma esporádica, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular tumoral (INCA, 2013).

1.5 Sintomatologia

As manifestações clínicas infelizmente, são pouco valorizadas pelo doente e pelo médico. O câncer colorretal, em estágio inicial, normalmente não apresenta sintomas, sendo, portanto, de fundamental importância a realização dos testes de rastreio (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Os sintomas mais prevalentes são alteração do hábito intestinal e emagrecimento, estando ambos presentes em aproximadamente 75% dos casos; seguidos de dor abdominal (62,5%), hematoquezia e anemia (37,5%), diarreia, obstipação ou ambos, vômito, sangramento. O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico varia de 2,3 meses a 10 meses (NETO et al, 2006).

Em geral, o câncer colorretal é diagnosticado em sua fase avançada, mesmo em indivíduos assintomáticos submetidos a rastreamento prévio por colonoscopia e, os sinais e sintomas podem variar de acordo com a localização do tumor (CRUZ et al., 2007).

1.6 Estadiamento da doença

Para o tumor de intestino, o estadiamento é determinado pela avaliação da extensão de sua penetração na espessura da parede intestinal, pela presença ou ausência de tumor nos linfonodos (metástases linfáticas), que habitualmente fazem parte da estrutura anatômica do órgão, ou pela propagação do tumor para outros órgãos (metástases), dos quais os mais frequentes são fígado, pulmão e ossos (INCA, 2013, PALMA et al. 2015).

O estadiamento definitivo envolve informações obtidas pelos resultados dos testes laboratoriais e radiológicos pré-operatórios, pelo patologista, através do exame histológico da peça cirúrgica retirada, e completado pela avaliação intra-operatória do cirurgião (INCA, 2013).

No pré-operatório a mensuração do antígeno carcino-embriônário (CEA) tem importância prognóstica e serve como parâmetro para acompanhamento pós-operatório (INCA, 2013). A investigação de eventuais metástases intra-abdominais e pélvicas deve ser feita por meio de exame ultrassonográfico (US) ou por tomografia computadorizada (TC). Já a investigação de metástases pulmonares deve ser efetuada por meio de exame radiológico simples de tórax. A Tomografia Computadorizada (TC) pode ser solicitada a critério clínico (INCA, 2013; PALMA et al., 2015).

Como a extensão da ressecção colônia está associada à presença de outras eventuais lesões, o exame colonoscópico faz também parte da pesquisa de eventuais lesões sincrônica (INCA, 2013). A infiltração e extensão do tumor de reto devem ser avaliadas pelo toque retal e, quando possível, pela ultrassonografia endorretal, principalmente para lesões pequenas, com possibilidade de tratamento local (INCA, 2013).

No período intra operatório, a ampla inspeção da cavidade abdominal, por via aberta ou laparoscópica, com biópsias das eventuais lesões suspeitas é, sem dúvida, uma medida recomendável para direcionamento do tratamento adjuvante. A ultrassonografia intra operatória, quando disponível, está indicada para avaliar a presença de eventuais metástases hepáticas não diagnosticadas por outros métodos diagnósticos (INCA, 2013).

A avaliação da agressividade tumoral e de sua invasibilidade é feita pelo exame anatomicopatológico do material ressecado na cirurgia. Várias classificações foram propostas, sendo mais usada a originalmente descrita por Dukes e posteriormente modificada por Astler-Coller (PALMA et al., 2015).

Atualmente, a classificação proposta pela União Internacional de Combate ao Câncer foi recomendada para uso geral, que é assim descrita:

T traduz a extensão do tumor primário, seu grau de penetração na parede intestinal: (Tx) - Tumor primário inacessível; (T0) – sem evidência de tumor primário (T1) - Tumor invadindo submucosa; (T2) – Tumor invadindo muscular própria (T3) - Tumor invadindo até subserosa ou tecidos pericólicos ou perirretais (T4) - Tumor invadindo diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou invadindo vísceras peritoniais. N traduz a presença ou ausência e extensão das metástases linfonodais: (Nx) - Linfonodos regionais inacessíveis; (N0) sem evidência de linfonodos regionais (N1) - Metástase em até três linfonodos pericólicos ou perirretais (N2) - Metástase em quatro ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais (N3) - Metástase em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular e/ou no linfonodo apical desta cadeia. M traduz a presença ou ausência de metástases a outros órgãos: (Mx) - Presença de metástases à distância não pode ser observada (M0) - Sem metástases à distância; (M1) - Metástases à distância. De acordo com a classificação TNM, obtém-se a classificação dos estádios de 0 a IV (INCA, 2013).

1.7 Diagnóstico

A pesquisa de sangue oculto nas fezes (TSOF) é um meio de diagnóstico não invasivo e relativamente simples utilizado na prática clínica (KASZTELAN & CICHOZ, 2008). As principais desvantagens são a baixa sensibilidade do método, o fato de possibilitar o diagnóstico numa fase avançada, já que a hemorragia tendencialmente ocorre mais tarde na progressão da doença e não permite a distinção da origem da perda hemática. Como a hemorragia pode ser intermitente, o TSOF poderá ser negativo em 50% dos doentes com câncer colorretal, constituindo uma limitação desta técnica. No entanto, um doente cujo TSOF seja positivo deverá ser submetido a um estudo com sigmoidoscopia, clister opaco e/ou colonoscopia (MAYER, 2008).

O exame de primeira linha para o estudo de uma suspeita de câncer colorretal é a biopsia coletada através do exame de imagem à colonoscopia (LESLIE, 2002). Um estudo prospectivo que considerou 13.580 colonoscopias realizadas por cirurgiões nos Estados Unidos (EUA) concluiu que a taxa de complicações associadas à técnica é baixa, tendo ocorrido perfuração em 0.02% dos casos submetidos à colonoscopia diagnóstica, hemorragia em 0.19% e perfuração em 0.15% dos casos com colonoscopia terapêutica (LEWIS, 2004).

A sigmoidoscopia é um outro método endoscópico utilizado no diagnóstico de câncer colorretal, permitindo a visualização do cólon até 60 cm (MAYER, 2008). Em cerca de 70 a 85% das vezes permite a identificação do tumor na sua localização mais habitual, não possibilitando, no entanto, o estudo da parte proximal do intestino grosso (MAYER, 2008; KASZTELAN & CICHOZ, 2008; PALMA et al., 2015).

A biopsia através da colonoscopia é o exame indicado para o diagnóstico de câncer colorretal, já que cerca de 10% dos tumores têm neoplasias síncronas, obrigando a um estudo completo do cólon.

1.8 Tratamento

Diversos estudos randomizados realizados nas últimas duas décadas ajudaram os especialistas em oncologia a elaborar uma estratégia multimodal de tratamento para o câncer colorretal. Esses estudos definiram o papel da cirurgia no tratamento do tumor primário e das metástases, bem como da terapia adjuvante e paliativa. Entre os doentes submetidos à ressecção curativa do tumor e quimioterapia adjuvante, se necessária, a sobrevida após 5 anos é de 65%. No entanto, a média de sobrevida dos pacientes com câncer colorretal avançado é menor que 5% após 5 anos.

Um dos fármacos de escolha para a quimioterapia é a oxaliplatina, um agente quimioterápico alquilante de terceira geração capaz de inibir a síntese e replicação de DNA (CARDUS et al., 2009; GOLDSTEIN et al., 2015). Entretanto, alguns pacientes apresentam resistência à ação da oxaliplatina (BOSSMAN & YAN, 2014; PANCZYK, 2014), e o quanto o metabolismo oxidativo estaria envolvido neste processo é uma questão em aberto.

1.9 Papel do metabolismo oxidativo no câncer colorretal

1.9.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Desde o final do século XIX, são conhecidos os efeitos tóxicos relacionados ao oxigênio. Mesmo assim, a identificação dos radicais livres somente foi descoberta a 50 anos, quando Denham Harman lançou sua teoria sobre o envolvimento destes radicais livres em processos de mutagênese, câncer e envelhecimento. Mas, somente com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), em 1969, foi que as pesquisas começaram a avançar (BELLÓ, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem todos os não radicais e radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de moléculas. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005). A mitocôndria é o principal local de produção das EROs (BARJA, 2007). Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa. Portanto, paradoxalmente, um processo fundamental para o desenvolvimento da vida dos eucariotos (fosforilação oxidativa) é também um dos principais responsáveis pela produção de ERO. Essas espécies são produzidas, ainda, por outras reações REDOX, como aquelas envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos, por exemplo o caso da oxidase NADPH (DOWNLING & SIMMONS, 2009).

A formação de radicais derivados do oxigênio em vários processos metabólicos exerce um papel importante no funcionamento do organismo. Eles são dose dependentes e, quando em baixas concentrações, são responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (DOWNLING & SIMMONS, 2009). As ERO passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes oxidantes. Os três principais tipos de ERO são: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-).

Dentre as EROs, o radical O_2^- é o mais comum e abundante, e bastante difusível tanto no interior quanto entre as células *in vivo*, sendo o primeiro radical

livre formado através da redução do oxigênio por um único elétron durante a fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria (HALLIWELL, 2007). É um radical pouco reativo e não tem habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o OH^- . Tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001; MAIA, 2006). Radical hidroxila (OH^-) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ERO. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001; MAIA, 2006). Este radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).

1.9.2 Defesas antioxidantes

Para evitar os danos causados pelos EROs, o organismo desenvolveu mecanismos de defesas, isto é, potenciais de neutralização das ações das EROs, os chamados mecanismos de defesa antioxidante.

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme a estrutura do agente antioxidante. Dentre os antioxidantes não-enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico (vitamina C), o qual inibe a ação do LDL oxidado e protege contra a ação das EROs, ácidos fenólicos, resveratrol, catequinas, β -caroteno (vitamina A), que protegem contra a lipoperoxidação e danos ao DNA, α -tocoferol (vitamina E), cobre (Cu), zinco (Zn), dentre outros (FITO et al., 2007; RODRIGO et al., 2007). Já entre as defesas antioxidantes enzimáticas, tem-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPX). A SOD catalisa a dismutação de O_2^- para H_2O_2 , enquanto CAT e GPX subsequentemente convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 , impedindo assim a produção de HO^- , a espécie mais reativa (CERUTTI , 1985; OBERLEY, 1980).

As superóxidos dismutases são enzimas que fazem parte da primeira linha de defesa antioxidante, sua ação consiste em converter o radical O_2^- em H_2O_2 , que é um radical menos agressivo, diminuindo assim o dano celular

(SCANDALIOS, 1993). Três isoformas da SOD são conhecidas, dependendo do íon contido em seu sítio ativo e o gene a partir do qual são sintetizadas. Assim, as mesmas diferem-se entre si pela sua estrutura, e não pela sua função propriamente dita:

SOD1: citoplasmática, dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD): é encontrada nos lisossomas e no núcleo de eucariontes, nos cloroplastos e em alguns procariotos e apresenta estrutura homodimérica (CEMELI et al., 2009).

SOD2: mitocondrial, dependente de manganês (MnSOD): é encontrada em procariotos e na mitocôndria de leveduras e animais e apresenta estrutura homotetramérica (SCANDALIOS et al., 2005).

SOD3: extracelular, dependente de cobre e zinco (Cu-ZnSOD): encontrada no meio extracelular e apresenta estrutura homotetramérica (ZELKO et al., 2002).

1.9.3 Superóxido Dismutase e Câncer

Estudos anteriores mostram que a SOD2 é uma molécula essencial para a vida (LI, 1995), devido a seu papel no combate às EROs, que em níveis exacerbados causam danos ao organismo, levando à morte. A estrutura física do gene da SOD2 é um homotetrâmero, com cada subunidade contendo 196 aminoácidos, codificada por um gene que possui cinco exons e 4 íntrons localizado no cromossomo 6q25. Essa proteína é expressa pelo DNA nuclear, sintetizada no citosol e transportada para a mitocôndria, onde irá exercer sua atividade antioxidante. É a primeira linha na defesa contra superóxidos produzidos pela fosforilação oxidativa. Os trabalhos sugerem que a SOD 2 é necessária para o funcionamento biológico normal de todos os tecidos, mantendo a integridade das enzimas mitocondriais suscetíveis à inativação direta pelos superóxidos (PIANTÁ, 2005).

A enzima SOD2 é produzida a partir de um gene nuclear localizado no cromossomo 6, sub região 6q25. O gene codifica para um homotetrâmero, o qual liga-se a um íon de manganês por subunidade. A proteína inativa da SOD2 é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e possui uma sequência peptídica conhecida como sequência mitocondrial alvo (Mitocondrial Target Sequence, MTS), que direciona a SOD2 para o interior da mitocôndria. Ao passar pelos poros da membrana mitocondrial interna, o segmento peptídico MTS é clivado por

lisossomos e a proteína madura se agrega em uma forma ativa, tornando-se funcional (ZELKO et al., 2002; SUTTON et al., 2005).

Estudos prévios identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*) na região MTS do gene da SOD2, em que uma tiamina (T) é substituída por uma citosina (C) no éxon 2, nucleotídeo 47. A substituição afeta o codon 16, que codifica para o aminoácido 9, mutando uma valina (GTT) em uma alanina (GCT), por isto o polimorfismo é chamado Val16Ala-SOD2 (ZELKO et al., 2002).

Dessa forma, existem dois alelos: A (Alanina) e V (Valina), e três possíveis genótipos: AA, AV e VV. Em termos fenotípicos, a variante Ala-SOD2 possui uma estrutura α-hélice, assim sendo facilmente importada para o interior da mitocôndria. Já a variante Val- SOD2 possui uma estrutura parcial de β-lamina, o que faz com que fique parcialmente retida nos poros da membrana mitocondrial interna. Já a variante Ala/Val-SOD2 apresenta estrutura helicoidal (SUTTON et al., 2005; BAG &BAG, 2008).

As células tumorais apresentam os níveis de expressão da enzima SOD2 aumentados em relação às células normais, justamente para promover a sua proteção frente a agentes estressores, como o O_2^- , e assim, promover a sobrevivência da célula (PANI et al, 2000).

Investigações prévias sugerem que a SOD2 é uma enzima antioxidante que age como um gene supressor tumoral. No entanto, os mecanismos moleculares de seu efeito antitumoral permanecem obscuros. Alguns estudos têm mostrado que a super expressão de SOD 2 inibe o crescimento de numerosos tipos de células tumorais (CULLEN,2003; DUAN, 2003). A inibição do crescimento da célula tumoral pode ser atribuído ao aumento no estado estacionário dos níveis de H_2O_2 como um resultado do aumento da atividade da SOD 2 (KIM et al, 2002).

Estudo indica uma deficiência relativa de SOD2 mitocondrial em tumores humanos (OBERLEY, 1980). O interesse nesta deficiência relativa da atividade da SOD2 foi muito aumentado pela observação de que a super expressão de SOD2 em células tumorais irá suprimir a divisão celular em cultura e o crescimento do tumor *in vivo*. Embora as razões precisas para essa relação entre a taxa de crescimento de células tumorais e atividade da SOD2 intracelular não sejam conhecidas, estes resultados suportam a ideia geral de que a diminuição da expressão de SOD2 pode promover o crescimento do tumor. De fato, como

resultado destas observações, concluíram que a SOD2 atua como um gene supressor de tumor (OBERLEY, 1980).

Porém, outro estudo mostra que a exposição de células tumorais a um inibidor da SOD2, como o 2-carbon (2-OH, 2-OCH₃), reduz a proliferação celular, já que há uma relação entre a modulação da SOD2 e os níveis de produção de p53. Uma super estimulação da SOD2 inibe a produção do p53, assim como, baixos níveis da SOD2 aumentam a produção do p53 (HUANG et al, 2000).

As células tumorais possuem uma baixa produção da enzima catalase, por conta disso, quando as células entram em contato com estimuladores da SOD2, como a manganese(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), ocorre a formação de H₂O₂ em excesso, o qual é responsável por causar citotoxicidade celular, o que pode desencadear a morte da célula (NICCO,2006).

Portanto, pode-se especular que no câncer colorretal, provavelmente o controle do ânion superóxido pode ser crítico, e por este motivo o aumento dos níveis de SOD2 seria uma estratégia metabólica para manter a homeostase e diminuir a proliferação dessas células. Esta premissa é suportada por estudos anteriores, como o que investigou o efeito de um mRNA que interfere na expressão do gene da SOD2 e agressividade do Câncer colorretal.

Um estudo utilizando outra linhagem celular de câncer colorretal (SNU-407) também mostrou que o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio e um gene de transcrição relacionado com um gene supressor de tumor, regulou a proliferação destas células. Uma investigação usando a linhagem celular de câncer colorretal T-84 também mostrou que o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio regulava a proliferação de células cancerosas e um gene supressor de fator de transcrição específicos do tumor de intestino, tipo caudal homeobox-1 (CDX1) aumentando (ZHANG et al, 2006).

A investigação epidemiológica, realizada recentemente por Zhang et al., 2013, destacou a relevância do sistema antioxidante enzimático na biologia do câncer colorretal. Estes autores analisaram a expressão do gene e da proteína de enzimas antioxidantes de 35 pacientes com câncer colorretal e observaram uma diminuição importante nos níveis de GPX em tecido tumoral quando comparado com os tecidos saudáveis. Na verdade, em ambas as situações, houve aumento dos níveis de SOD2 e diminuição dos níveis de GPX que levou a um aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio nas células (ZHANG et al, 2013).

1.10 O modelo do desbalanço AS-HP

Um grande conjunto de evidências sugere que o estresse oxidativo está associado com envelhecimento celular, disfunções e doenças (LEITE et al., 2012). Entretanto, por muito tempo se acreditou que as EROs eram as grandes responsáveis por estes processos deletérios. Por este motivo, há cerca de 20 anos foram iniciados estudos para averiguar o impacto benéfico na saúde da suplementação de grande quantidade de antioxidantes. Os resultados, surpreendentemente, não foram bons. Ao contrário, em alguns estudos ocorreu maior carga de morbidade nos pacientes suplementados com altas doses de vitamina do que no grupo placebo. A explicação para este aparente paradoxo logo emergiu: muitas EROs, em baixas concentrações eram na realidade moléculas sinalizadoras de diversas funções celulares. Entre estas, destacam-se o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (WALLACE, 1999).

A partir de então, começou a emergir a relevância da manutenção do equilíbrio redox, que pode ser diferente para cada tipo de célula ou tecido, segundo o seu momento de desenvolvimento e a sua função. Por exemplo, monócitos têm baixos níveis de superóxido e óxido nítrico. Entretanto, quando ocorre uma invasão de microrganismos ou uma lesão corporal, eventos que desencadeiam a inflamação, estas células se transformam em macrófagos e passam a produzir níveis elevados de EROs, a fim de combater a infecção ou mesmo de realizar a limpeza dos debrídos celulares originados por traumas físicos (DUSSE et al., 2003).

Se é uma verdade que uma célula saudável deve manter o seu equilíbrio REDOX, uma questão que precisa ser esclarecida é se existe alguma reação oxidativa chave que, quando desbalanceada, pode causar disfunções celulares ou mesmo aumentar o risco de doenças como o câncer. Estudos com o polimorfismo Val16Ala-SOD2 (BRESCIANI et al., 2013) subsidiaram a formulação da hipótese de que o desbalanço AS-HP poderia ser a reação chave associada com alterações no metabolismo oxidativo, estresse oxidativo, disfunções e doenças. Se esta hipótese é verdadeira, este desbalanço também poderia influenciar a biologia de células tumorais incluindo a resistência das mesmas ao tratamento quimioterápico. Esta

hipótese foi então inicialmente testada por Dal Berto et al (2015) que descreveram o impacto do desbalanço AS-HP em células de câncer de próstata.

Com base nestas evidências, considerando que existe um número relativamente grande de casos de resistência a quimioterápicos em pacientes de câncer colorretal (PANCZYK, 2014), o presente trabalho teve como perspectiva realizar estudos para melhor compreender o papel do desbalanço AS-HP. Isto porque, como SOD2 dismuta ânion superóxido continuamente em peróxido de hidrogênio, de fato, o desequilíbrio desta reação pode ser o principal fator na regulação do câncer colorretal, e não só a desregulação da enzima SOD2. Neste caso, o impacto no desbalanço AS-HP na avaliação sobre o câncer colorretal com o uso de fármacos que promovem esse desbalanço farmacologicamente, sugeriu-se que foi considerado significativo.

Metástases do câncer colorretal permanecem como uma doença letal com prognóstico ruim para a maioria dos pacientes. Em anos recentes, se desenvolveu estratégias terapêuticas que usam combinação de múltiplos fármacos, a fim de melhorar a taxa de sobrevivência destes pacientes. Novos agentes quimioterápicos também tem sido desenvolvidos. Entretanto, muitos pacientes apresentam resistência a fármaco como a oxaliplatina (TEMRAZ et al., 2014).

A oxaliplatina é um quimioterápico utilizado rotineiramente no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer colorretal. Geralmente, a descontinuação do tratamento com este fármaco ocorre devido ao aparecimento de neuropatia periférica, e também pela ocorrência de progressão tumoral. Parece que a resistência à oxaliplatina envolve mutações em genes importantes para a biologia do câncer e, por este motivo, foi recentemente desenvolvido um painel de oito polimorfismos genéticos que podem indicar resistência à oxaliplatina (DI FRANCIA et al., 2013). Entretanto, muitas vezes, mesmo sem a presença destes polimorfismos, pode ocorrer resistência quimioterápica. Por este motivo, entender o papel do desbalanço AS-HP na resposta de células de câncer colorretal tratadas com oxaliplatina pode abrir caminho para o desenvolvimento futuro de suplementos alimentares que auxiliem na sensibilização deste câncer à quimioterapia com oxaliplatina.

Assim, com base nestas considerações realizar o estudo sobre o papel do desbalanço AS-HP na biologia do câncer colorretal foi então aplicado o modelo farmacológico descrito em Dal Berto et al (2015), do qual são utilizados dois compostos, paraquat e porfirina, para criar o mesmo.

1.11 Paraquat

O paraquat é um sal solúvel em água que desseca rapidamente todo o tecido verde no qual entra em contato, amplamente utilizado em agricultura, não é volátil, explosivo ou inflamável em solução aquosa (PERON et al., 2003). Geralmente é comercializado como Gramoxone®, Gramocil®, Agroquat®, Gramuron®, Paraquat®, Paraquol® e também em misturas com outros princípios ativos, como o Secamato®. Os seus sais são eletrólitos fortes que, em solução, dissociam-se em uma grande quantidade de íons positivos e negativos (SERRA et al., 2003).

Seu nome comum é PARAQUATE (Paraquat), com nomenclatura química de 1,1'-dimethyl- 4,4'-bipyridinium, fórmula bruta com C₁₂H₁₄N₂ e fórmula estrutural:

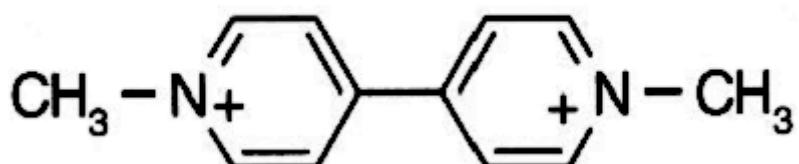


Figura 2- Fórmula Estrutural do herbicida Paraquat

Fonte: SERRA et al., 2003.

O paraquat é um herbicida de baixa toxicidade crônica, uma vez que é rapidamente desativado em contato com o solo. Ao longo dos últimos anos, tem sido muito utilizado como modelo de estudo em estresse oxidativo tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Ao reagir com NADPH, é reduzido ao radical paraquat. Sua reação espontânea com oxigênio gera radical superóxido, regenerando o paraquat que, por sua vez poderá novamente ser reduzido. Sua toxicidade é associada à produção de superóxido, uma vez que seu efeito é inibido após administração de SOD (SERRA et al., 2003).

1.12 Porfirina

Porfirinas são compostos macrocíclicos tetrapirrólicos altamente conjugados derivados da porfirina. Tais compostos estão presentes em diferentes proteínas, exercendo funções indispensáveis para o organismo, tais como o transporte e o armazenamento de oxigênio promovidos pela hemoglobina e mioglobina, respectivamente; o transporte de elétrons mediado por citocromos a, b e c (entre outros); a oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos catalisada por enzimas monooxigenases, como citocromos P450 e peroxidases; e a dismutação de peróxido de hidrogênio catalisada pela catalase (MILGROM, 1997; EICHER & HAUPTMANN, 2003).

As porfirinas são definidas como uma grande classe de moléculas púrpuras ou fortemente coradas, de origem natural ou sintética, constituindo-se de macrociclos tetrapirrólicos que se ligam a um metal de transição como Manganês, Zinco e Ferro, os quais modulam suas propriedades (KOOLMAN & RÖHM, 2005).

Essas moléculas exercem papel importante em diferentes sistemas biológicos e têm várias aplicações já demonstradas em áreas que vão do controle do câncer à degradação de compostos fenólicos em efluentes (BUEGE & AUST, 1978). Uma das mais importantes aplicações das porfirinas e metaloporfirinas se dá na medicina. Derivados porfirínicos têm sido empregados como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica (TFD), devido a propriedades como alta fotossensibilização, alta afinidade por tecidos tumorais e toxicidade relativamente baixa (OLIVEIRA, 2002). Estudos realizados utilizando porfirinas contendo íons de zinco e ferro revelam que estes fotossensibilizadores atuam gerando oxigênio singlete na presença de luz e causando danos ao DNA.

Metaloporfirinas estão sendo exploradas no tratamento de patologias em que o desequilíbrio redox associado ao estresse oxidativo resulta em danos oxidativos a biomoléculas e compromete a integridade metabólica de células, tecidos e/ou órgãos (TOVMASYAN et al., 2014, BATINIC-HABERLE et al., 2011, BATINIC-HABERLE et al., 2010). Dentre as espécies envolvidas no estresse oxidativo, pode-se destacar o O_2^{\cdot} , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico ($\cdot NO$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). Essas espécies têm sido amplamente

reconhecidas como espécies que afetam o equilíbrio redox celular e desempenham um papel central na maioria dos processos de estresse oxidativo e são comumente chamadas espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (BATINIC-HABERLE et al., 2011).

Embora algumas dessas espécies estejam envolvidas em processos fisiológicos importantes (por exemplo, controle da pressão arterial), a produção exacerbada e descontrolada de EROs/ERNs resulta em oxidação/nitração de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, entre outros, alterando a integridade física da célula, seus processos metabólicos e as vias de transdução de sinal celular; isto conduz eventualmente a condições patológicas (BATINIC-HABERLE et al., 2011). Uma vez que EROs/ERNs são sensíveis à modulação redox, há um grande interesse no desenvolvimento de complexos metálicos redox-ativos como fármacos em potencial.

As enzimas superóxido dismutase têm papel essencial no controle do nível celular de ERO (via modulação direta de O_2^-) e de ERN (via modulação indireta de $ONOO^-$) e, por conseguinte, na regulação do nível de estresse oxidativo de células, órgãos e tecidos (BATINIC-HABERLE et al., 2009). Essas enzimas existem em quatro isoformas: CuZnSOD, MnSOD, FeSOD e NiSOD, porém apenas duas isoformas estão presentes em humanos (CuZnSOD e MnSOD).

A dismutação do superóxido pelas enzimas SOD ocorre com constante de velocidade ($\log k_{cat}$) de aproximadamente 9 e potencial de redução ($E^{1/2}$) de aproximadamente +300 mV vs NHE (BATINIC-HABERLE et al., 2013). Embora as enzimas SOD não contenham o anel porfirínico como grupo prostético, o planejamento de modelos biomiméticos à base de porfirinas foi estimulado pela possibilidade de modulação do potencial redox de metaloporfirinas sintéticas a partir da escolha adequada dos substituintes no anel porfirínico dos modelos (BATINIC-HABERLE et al., 2011). A correlação entre as propriedades redox e a atividade catalítica ($\log k_{cat}$) de metaloporfirinas neutras, aniônicas e catiônicas foi investigada (DE FREITAS-SILVA et al., 2008). Observou-se que as Mn-porfirinas catiônicas dão origem a mímicos promissores de SOD, sendo alguns complexos capazes de oxidar e reduzir o superóxido com constantes de velocidade de dismutação próximas às da enzima SOD.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do desbalanço farmacológico AS-HP na viabilidade, taxa de proliferação celular, na resposta ao quimioterápico oxaliplatina e modulação da expressão de genes do ciclo celular, apoptose e metabolismo oxidativo em células de câncer colorretal da linhagem comercial HT-29.

2.2 Objetivos Específicos

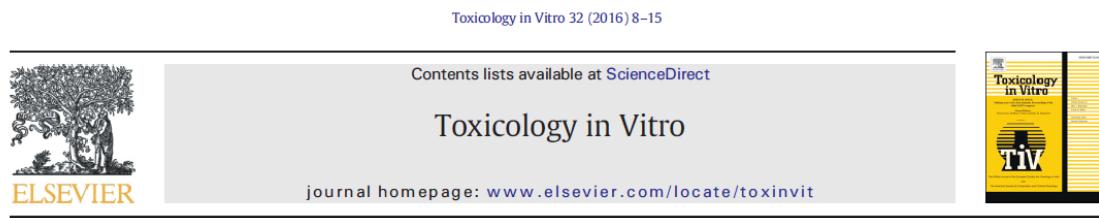
Em células HT-29 expostas ao paraquat e porfirina avaliar o efeito:

Na citotoxicidade celular a

- Na citotoxicidade e indução de apoptose;
- Na proliferação e ciclo celular;
- Na resposta das células do câncer colorretal ao tratamento com oxaliplatina;
- Na modulação da expressão de genes associados ao controle da divisão celular, apoptose e metabolismo oxidativo.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados, bem como a metodologia utilizada no presente estudo estão organizados sob a forma de artigo científico, o qual foi publicado na revista científica *Toxicology In Vitro*, Fator de Impacto: 3,047 (Anexo 1, Figura 3).



Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response

Verônica Farina Azzolin ^a, Francine Carla Cadoná ^b, Alencar Kolinski Machado ^a, Maiquidieli Dal Berto ^d, Fernanda Barbisan ^a, Eduardo Bortoluzzi Dornelles ^b, Werner Giehl Glanzner ^c, Paulo Bayard Gonçalves ^c, Claudia Giugliano Bica ^d, Ivana Beatrice Mânicca da Cruz ^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c BIOREP Lab, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

Figura 3 Informações editoriais

Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response

Verônica Farina Azzolin¹, Francine Carla Cadoná ², Alencar Kolinski Machado¹, Maiquidieli Dal Berto⁴, Fernanda Barbisan¹, Eduardo Bortoluzzi Dornelles², Werner Giehl Glanzner³, Paulo Bayard Gonçalves³, Claudia Giugliano Bica⁴, Ivana Beatrice Mânicia da Cruz ^{1,2*}

1 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

2 Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

3 BIOREP Lab, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

4 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

* The author to whom correspondence should be addressed. Tel: +55 5532208163; Fax: 55 5532208239; Email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

The role of superoxide dismutase manganese dependent enzyme (SOD2) in colorectal cancer is presently insufficiently understood. Some studies suggest that high SOD2 levels found in cancer tissues are associated with cancer progression. However, thus far, the role of colorectal cancer superoxide-hydrogen peroxide imbalance has not yet been studied. Thus, in order to address this gap in extant literature, we performed an in vitro analysis using HT-29 colorectal cell line exposed to paraquat, which generates high superoxide levels, and porphyrin, a SOD2 mimic molecule. The effect of these drugs on colorectal cancer cell response to oxaliplatin was evaluated. At 0.1 μ M concentration, both drugs exhibited cytotoxic and antiproliferative effect on colorectal cancer cells. However, this effect was more pronounced in cells exposed to paraquat. Paraquat also augmented the oxaliplatin cytotoxic and antiproliferative effects by increasing the number of apoptosis events, thus causing the cell cycle arrest in the S and M/G2 phases. The treatments were also able to differentially modulate genes related to apoptosis, cell proliferation and antioxidant enzyme system. However, the effects were highly variable and the results obtained were inconclusive. Nonetheless, our findings support the hypothesis that imbalance caused by increased hydrogen peroxide levels could be beneficial to cancer cell biology. Therefore, the use of therapeutic strategies to decrease hydrogen peroxide levels mainly during oxaliplatin chemotherapy could be clinically important to the outcomes of colorectal cancer treatment.

Key words: Superoxide dismutase manganese dependent. Porphyrin. Paraquat. HT-29 colorectal cell. Chemotherapy.

1 Introduction

Biological role of superoxide dismutase manganese dependent enzyme (MnSOD/SOD2) in healthy cell metabolism is undisputable since, under oxidative stress conditions, this enzyme is considered as the first line of mitochondrial defense against oxidative damages by removing excessive superoxide anion [1, 2]. However, the role of SOD2 cancer cells is not completely understood, and several conflicting results have been published in the literature including genetic investigations of some polymorphism such as Val16Ala-SOD2 [3,4]. In the first studies involving SOD2 and cancer performed during the 70s, Oberley and Buettner proposed that SOD2 could be a tumoral suppressor molecule [5]. However, contrary evidence reinforced the dual nature of SOD2 in tumor development and progression, depending on cancer type and stage. In some cases, such as breast cancer, high levels of SOD2 genetically determined an increased risk of cancer development, whereas low SOD2 levels were found to stimulate the metastasis occurrence [6,7].

In colorectal cancer in particular, controversial results related to SOD2 enzyme have been reported. An investigation conducted by Janssen and colleagues showed that colorectal tumor tissues present up to four times more SOD2 than normal mucosa [8]. A more recent study conducted by Nozoe et al. revealed that high SOD2 content was associated with colorectal lymph node metastasis and with poor 5-year overall survival [9]. Supporting these findings, some causal mechanisms associated with high SOD2 levels and colorectal cancer development and metastasis have been reported since. Authors that examined causal mechanisms suggested that SOD2 could induce the colorectal cancer surveillance by apoptosis inhibition from down-regulation of molecules, such as factor-related apoptosis-inducing ligant (TRAIL) [10]. In addition, SOD2 overexpression caused by down-regulation of microRNA-212 has been related to colorectal tumor metastasis [11]. On the other hand, a study performed by Zhang and colleagues pointed toward a strong antitumoral effect in cells with SOD2-TRAIL genes obtained from a replication-competent recombinant adenovirus with E1B 55-kDa gene deletion (ZD55). According to the authors, the overexpression of SOD2-TRAIL genes promoted tumor

suppression, as production of hydrogen peroxide derived from SOD2 activated caspase-8 triggering apoptosis events [12].

These results make understanding of the role of SOD2 in colorectal cancer biology very difficult. As SOD2 continually dismutates superoxide anion in hydrogen peroxide, it is likely that the imbalance of this reaction could be the main factor in colorectal cancer regulation, and not just SOD2 enzyme regulation. This assumption is corroborate by a recent study that suggest that glutathione peroxide 1 gene (GPX1) may play a critical role in the development of colorectal cancer [13,14]. In this case, evaluation of the superoxide-hydrogen imbalance effects on colorectal cancer using pharmacological drugs can be considered relevant. Therefore, we performed an *in vitro* analysis using HT-29 colorectal cell line exposed to two drugs (paraquat and porphyrin) that induce superoxide-hydrogen peroxide imbalance. Paraquat is an organic compound that interferes with electron transfer through the reduction in the number of donor electrons, such as NADPH in the mitochondria, increasing the superoxide anion levels. On the other hand, porphyrin is a SOD2 mimic molecule that increases the rate conversion of superoxide anion in hydrogen peroxide [12, 13]. We also tested the effect of this imbalance on the colorectal cell response to oxaliplatin chemotherapeutic drug in order to determine whether superoxide-hydrogen peroxide imbalance plays a role in cancer drug resistance.

2 Materials and methods

An *in vitro* investigation using human cancer colorectal HT-29 cell line (ATCC HTB38 - Rio de Janeiro Cell Bank, RJCB 0111, Brazil) was performed in controlled conditions. Cells were exposed to paraquat and porphyrin in order to generate a superoxide and hydrogen peroxide imbalance. Its effect on viability, apoptosis induction, cell proliferation, cell cycle modulation and expression of antioxidant and apoptotic genes was subsequently evaluated. The influence of this imbalance on oxaliplatin effect on HT-29 cells was concomitantly analyzed in our protocols.

2.1 Cell culture conditions

The cell cancer line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. Cell suspension was placed in each of 96-well plates (2.5 x 10⁵ cells/well). After cell attachment, the cultures were treated with paraquat, porphyrin and oxaliplatin. Further, the cells were incubated at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 and 72 hours in order to produce the assays.

2.2 Viability and cell proliferation assay

The HT-29 viability and cellular proliferation were initially evaluated by MTT Assay. The supernatant of the treatments was removed and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01M; pH 7.4). The MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in a 5 mg/mL PBS added into a 96-well plate containing the sample treatments and was incubated for 1 hour at 37 °C. Next, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200 µL of DMSO (dimethyl sulfoxide). The absorbance at 560 nm was read in the fluorimeter[15].

2.3 Apoptosis and cell cycle assays by flow cytometry

Complementary analyses of flow cytometry were performed to confirm the treatment cytotoxicity using Anexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™). Anexin-V-FITC can detect early apoptotic process, whereas PI allows identifying late or necrotic apoptotic cells. The detection is realized through the bond the cell receptors form with these fluorescents antibodies, Anexin-V and PI. The analysis was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 1 x 10⁶ cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM and were incubated for 24 hours. Following incubation, the cells were trypsinized in order to ensure that they are detached and were washed twice with cold PBS

before being resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. After transferring the cells into 100 μL of the solution (1×10^5 cells), the contents were placed into a 5 mL culture tube. The resuspended cells were subjected to gentle vortex and were stained with 5 μL of Annexin-V-FITC and 5 μL of PI. Following a short incubation (15 min) in the dark at room temperature, 400 μL of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications [16].

The cell cycle analysis [17] was also performed using flow cytometry after 24 hours and 72 hours of HT-29 prior to being treated with paraquat, porphyrin and oxaliplatin. The PI reagent binds to the DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. PI also binds to RNA, necessitating treatment with nucleases to distinguish between RNA and DNA staining. In our work, cells were seeded in 6-well plates at 5×10^4 cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM and were incubated for 24 and 72 hours. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol. Further cells were stored at -20°C overnight. Prior to conducting analyses, the cells were centrifuged and washed once with PBS, before being resuspended in 500 μL PI-solution in PBS: 50 $\mu\text{g/mL}$ PI from 50x stock solution (2.5 mg/mL) 0.1 mg/mL RNase A 0.05% Triton X-100 and incubated for 40 min at 37°C . Finally, 3 mL of PBS was added for washing and was resuspended in 500 μL PBS for flow analysis.

2.4 Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was extracted using Trizol, following manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The extracted RNA was measured by Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer at the 532 nm wavelength. For realizing the reverse transcription, RNA was used, whereby the samples of RNA (1 $\mu\text{g/mL}$) were added to 0.2 μL of DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 5 minutes, followed by heating at 65°C for 10 minutes. The cDNA was generated with 1 μL of Iscript cDNA and 4 μL of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The reaction consisted of the following steps: heating at 25°C for 5 minutes, at 42

°C for 30 minutes, and at 85 °C for 5 minutes, followed by incubation at 5°C for 60 minutes. qRT-PCR was realized in the Passo One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) with SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 95 °C for 3 minutes, 40 cycles of 95 °C for 15 seconds, and 60 °C for 1 minute. The reactions of each sample were made in triplicate, using 0.5 µM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the final volume of 15 µL. The Beta-acting gene played the housekeeping role [18]. The characteristics of the primers used are presented in the (Table 1).

Genes	Primers	
	Sense	Antisense
β actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTGTCA
CAT	GATAGCCTTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTCAAGGAT
SOD 1	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCACAAGCAAACGACTT
SOD 2	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
GPx	GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT
BAX	CCCTTTCTACTTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
BCL-2	GAGGATTGTGGCCTCTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
CASP 8	AAGGAGCTGCTTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT
CASP 3	TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG	TACCAAGTGCATGGAGAAATGS
p53	TTGGGTCTTGAACCCTGCT	GTGCAGGCCAACTTGTTCACT

Table 1. Gene primers list

2.5 Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation (SD). All experiments were replicated tree times. To perform the statistical analysis we used mean ± standard error of each independent experiment. To calculate means of each treatment, outlier's data from repeated wells with variation more than 20% around means were excluded since clearly represented experimental errors. The results pertaining to viability and antiproliferative effect of paraquat, porphyrin and oxaliplatin were expressed as a percent (%) of control group. Therefore, the data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Dunnett Test. The statistical tests were performed using Graph Pad Prism Software.

3 Results

3.1 Effects on viability and apoptosis

Initially, we determined the effect of several paraquat and porphyrin concentrations on the viability of colorectal cells. The findings revealed that all paraquat and porphyrin concentrations (0.1, 1, 3 and 5 μ M) tested here caused significant mortality when compared to the control group ($p = 0.001$). As the paraquat and porphyrin mortality effect was higher than that of oxaliplatin (20 μ M), we chose to perform the remaining tests using the minimal concentration (0.1 μ M) of these drugs, in order to match their cytotoxicity to that caused by oxaliplatin. The results showed that, in isolation, both drugs caused higher mortality. However, in the presence of oxaliplatin, a significant decrease in mortality was observed, especially when paraquat was combined with porphyrin (Figure 1A, 1B).

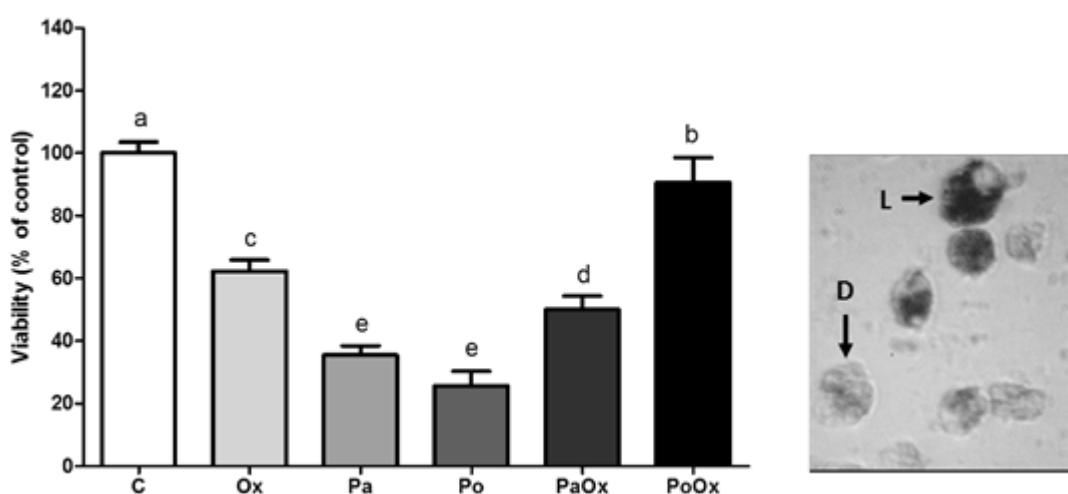


Figure 1- Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell line viability after 24 h cultures. (A) Viable cells frequency determined by MTT spectrophotometric assay. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p < 0.05$). Data are shown as % of untreated control group; (B) Live (L) and dying (D) cells during MTT assay reaction.

We performed additional tests to establish whether the toxic effects of paraquat and porphyrin involved necrosis or apoptosis pathways. In relation to

the control group (treated as 100%), all treatments increased the number of cells that underwent necrosis. However, the effect was most pronounced in cells treated with paraquat alone (44.6%) or paraquat combined with oxaliplatin (28.6%). The frequency of apoptosis events (early + late apoptosis) was significantly increased in cells treated with oxaliplatin (281.1% in relation to the control), as well as in cells exposed to paraquat (130.4% in relation to the control) and in cells treated with paraquat combined with oxaliplatin (208.9% in relation to the control).

In contrast, porphyrin significantly reduced the apoptosis frequency (78.5%) when compared to the control group. This reduction was more accentuated when cells were concomitantly exposed to porphyrin and oxaliplatin (34.2% in relation to the control group) (Figure 1C).

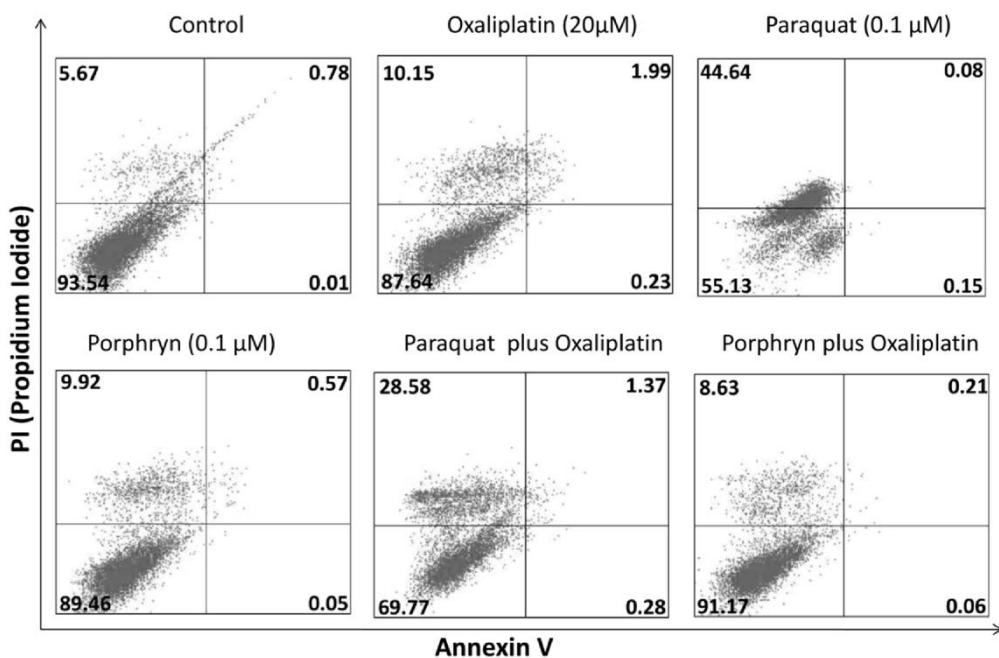


Figure 1(C) - Flow cytometry analysis with propidium iodide (PI) and annexin V to evaluate the influence of treatments on necrosis and apoptosis induction. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

3.2 Effects of paraquat and porphyrin on cell proliferation

Colorectal cancer cells were exposed to different concentrations of paraquat and oxaliplatin with and without oxaliplatin and the results are presented in (Figure 2). Both paraquat and porphyrin significantly decreased

the cell proliferation after 72 hours in culture when compared to the control group ($p = 0.0001$). However, this effect was more pronounced in paraquat treatment relative to porphyrin. In cells treated with oxaliplatin, the concomitant exposure to paraquat decreased the cell proliferation rate even further. However, at almost all concentrations tested here, porphyrin did not change the proliferation rate of cells exposed to oxaliplatin.

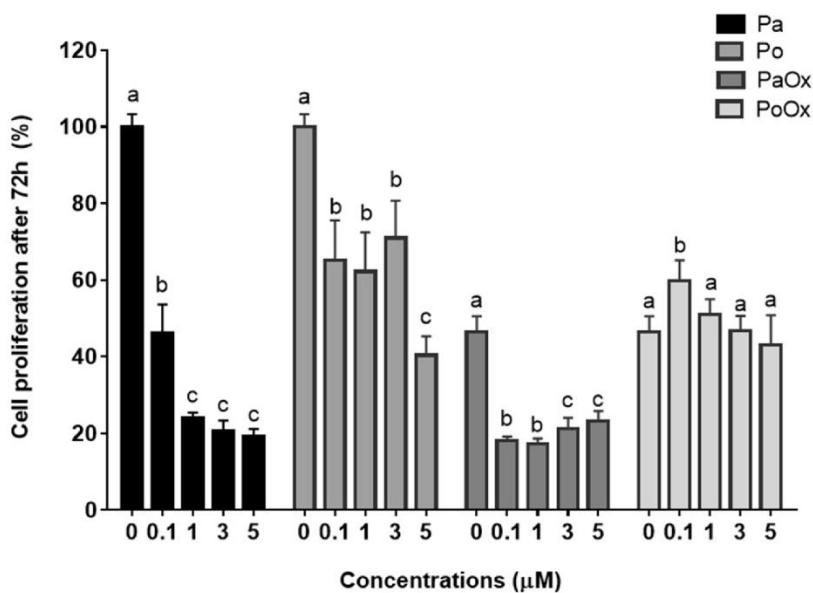


Figure 2- Effect of different concentrations of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell proliferation after 72 h determined by MTT spectrophotometric assay. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p < 0.05$); Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

3.3 Effects of paraquat and porphyrin on cell cycle

The potential paraquat and porphyrin effects on cell cycle after 24 and 72 hours exposure were also investigated by subjecting HT-29 colorectal cancer cells to two types of analysis. Firstly, changes in cell cycle between 24 and 72 hours time points were evaluated separately for each treatment type. Next, the frequency of cells in each cycle was compared to the control group after 24 and 72 hours of exposure.

In the control group, when the cell cycle changes were examined between the 24 and 72 hours time points, an increase of 19% in the G1 phase cells, as well as a decrease of 10% in the S and 8% in the M/G2 cells was noted. Oxaliplatin treatment changed this pattern, as a slight increase in S (9%) and M/G2 cells (5%) was observed, when compared to the values obtained at 24 hours, indicating cell cycle interruption. Paraquat treatment did not result in any differences in the cell cycle after 24 hours of exposure when compared to the control group. However, after 72 hours, S phase cells remained elevated (Figure 3).

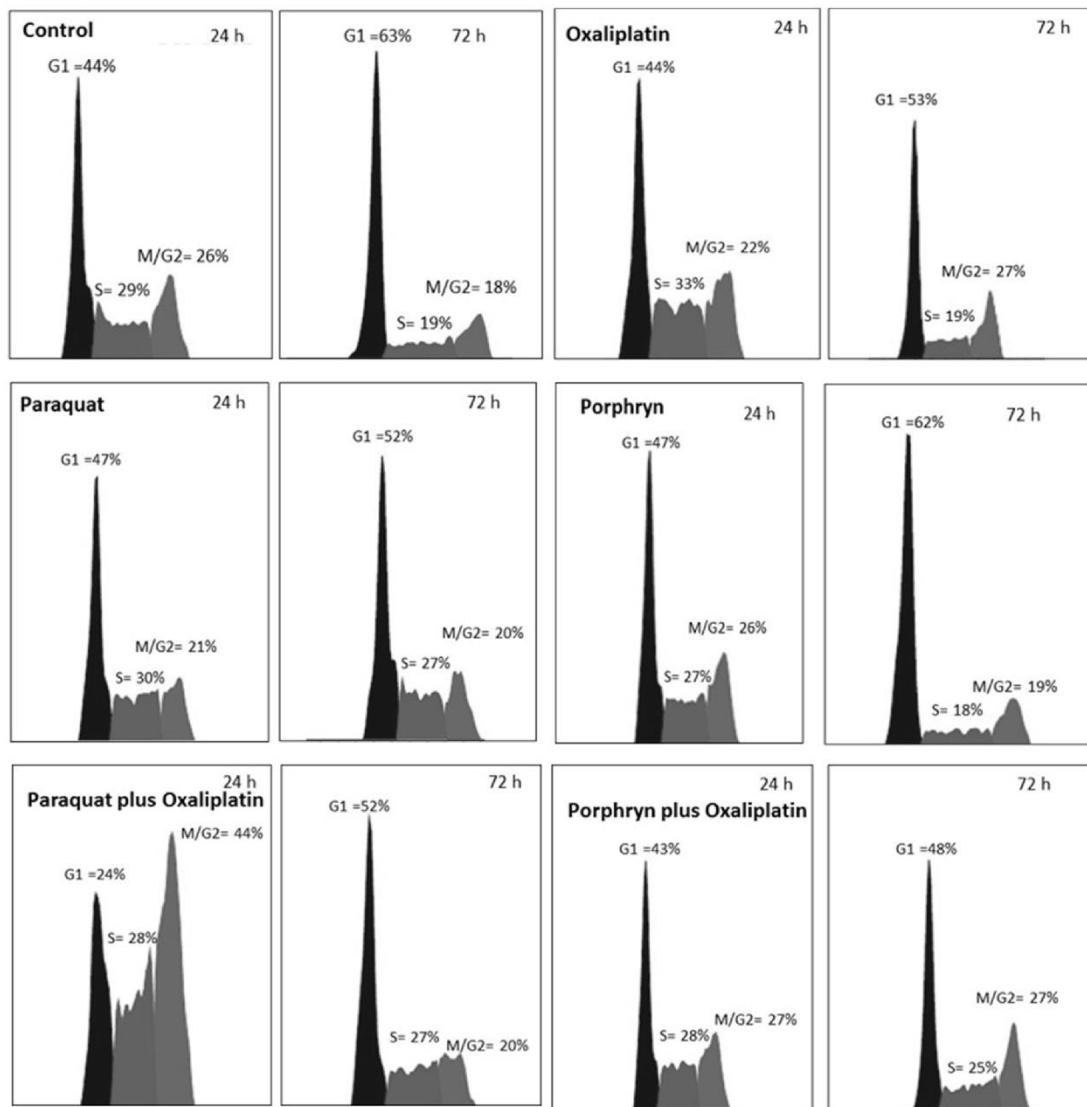


Figure 3- Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell cycle determined by flow cytometry after 24 and 72 h exposition. Representative graphics with cell phases: (G0/G1= gap 1; S= synthesis; G2/M= gap2 and mitosis). Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

The increase in the number of G1 cells after 72 hours was also lower than in the control when cells were treated with paraquat (5%). However, the porphyrin presented similar cell cycle pattern to that observed in the control group. The paraquat plus oxaliplatin treatment produced more diverse changes in cell cycle after 24 hours of treatment, whereby higher levels of cells in the S and M/G2 phase were observed when compared to the control group. After 72 hours, this effect was not as pronounced despite the frequency of S and M/G2 cells being higher than in the control group. On the other hand, when cells were treated with oxaliplatin plus porphyrin, the cell cycle pattern did not change at 24 and 72 hours time points ($p = 0.430$). In contrast, when administered in isolation, exposure to porphyrin did not significantly change the cell cycle when compared to the control group. On the other hand, the treatment with paraquat plus oxaliplatin resulted in extensive changes in the cell cycle pattern. After 24 hours, was observed a significant reduction in the G1 cells, along with an increase in the M/G2 cells, when compared to the control group. After 24 hours, while the number of G1 cells increased, the frequency of the S phase cells remained higher than in the control and in the sample treated with oxaliplatin only. Similar effects were observed in cells treated with porphyrin plus oxaliplatin.

In the second cell cycle analysis, the frequency of cells in each cell cycle phase was compared to the control group (Figure 4). When compared to control group, after 24 hours of oxaliplatin treatment, the frequency of G1 cells significantly increased. This result was also observed in cells treated with oxaliplatin plus porphyrin.

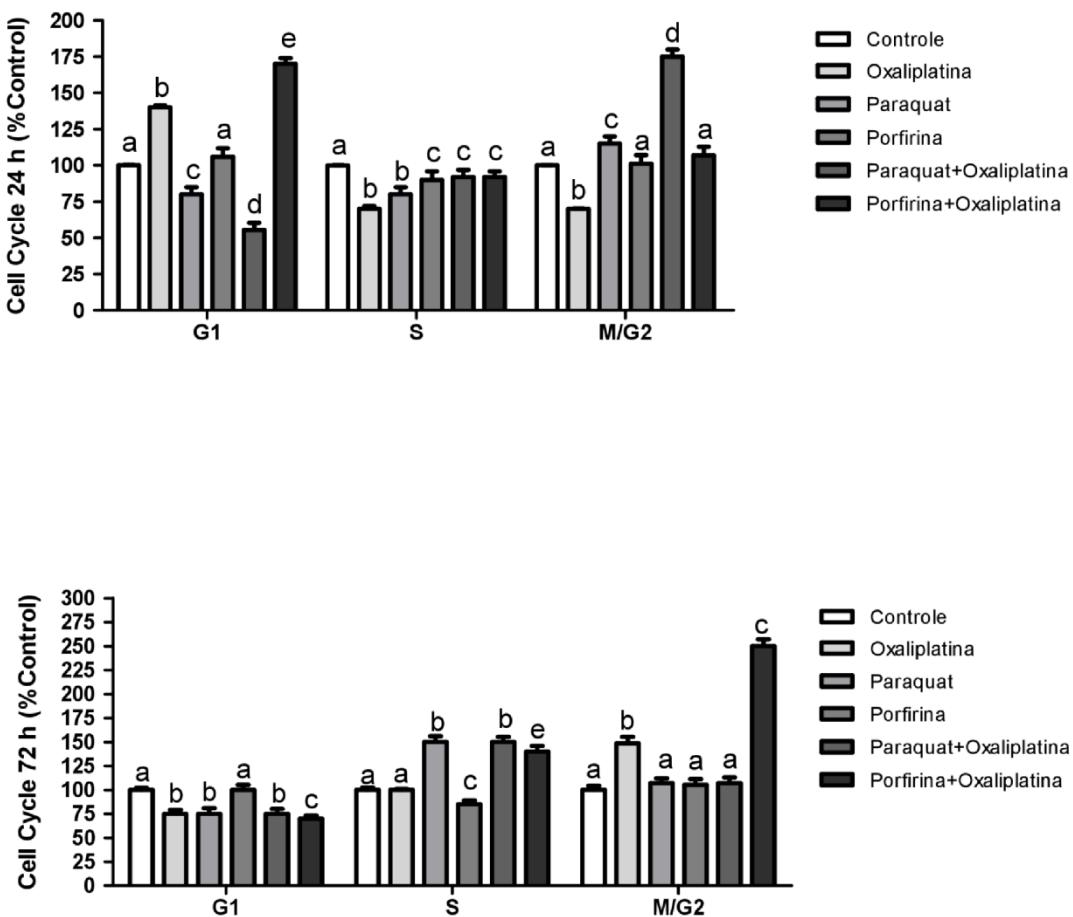


Figure 4- Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell cycle determined by flow cytometry after 24 and 72 h exposition. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p < 0.05$); Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

However, treatments with paraquat alone, as well as combined with oxaliplatin, produced inverse results, as the frequency of G1 cells decreased after 24 hours of exposure. Porphyrin treatment did not change the G1 frequency when compared to the control group. All treatments significantly decreased the frequency of the S phase cells when compared to the control group. When subjected to oxaliplatin treatment, the frequency of M/G2 cells was lower than that observed for paraquat treatments (with and without oxaliplatin). In cells treated with porphyrin (with and without oxaliplatin), this phase was also similar to the control. After 72 hours, with the exception of

porphyrin (which did not change the cell cycle when compared to the control group), all other treatments significantly decreased the frequency of G1 cells when compared to the control group. Paraquat with and without oxaliplatin, as well as porphyrin plus oxaliplatin, increased frequency of the S phase cells. In addition, the frequency of cells in M/G2 phase was similar to the control group, with the exception of cells treated with oxaliplatin only, or those treated with porphyrin plus oxaliplatin.

3.4 Acute effects of paraquat and porphyrin on gene modulation

Given that paraquat and porphyrin cause cell oxidative imbalance, we performed a complementary analysis to evaluate the acute effects of the exposure to these drugs on the modulation of expression of nine genes related to cell cycle, apoptosis and antioxidant enzymes (Figure 5). This analysis was performed after 6 hours exposure to all treatments. The results revealed a heterogeneous pattern of gene regulation according to each treatment, indicating that genes studied here are very sensitive to the cell oxidative status.

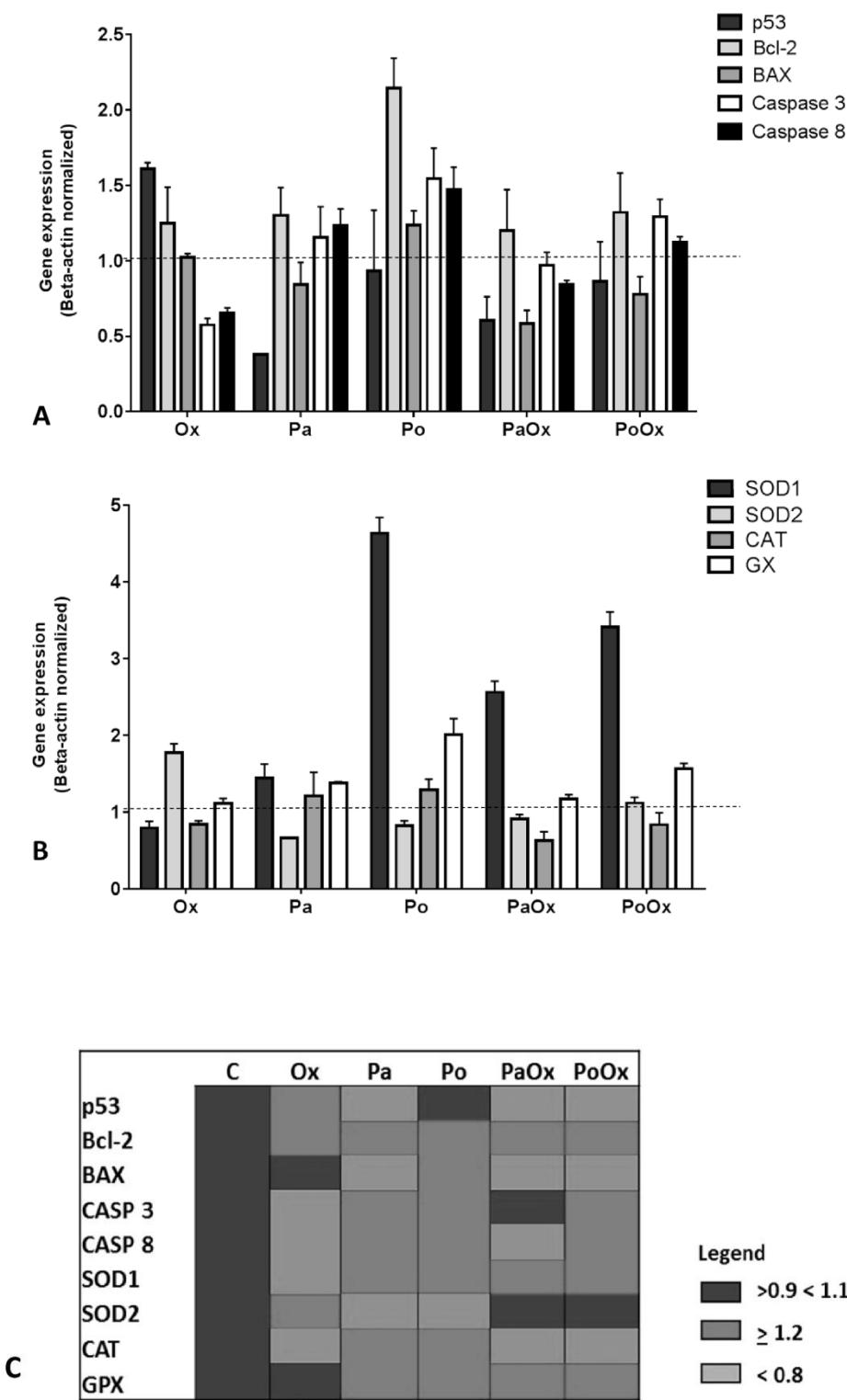


Figure 5- Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on gene expression of HT29 colorectal cancer cell cycle. (A) Genes related to apoptosis pathway; (B) Antioxidant enzyme genes; (C) Representative scheme of gene modulation in the different treatments. Data were normalized by B-actin gene. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

In relation to genes associated with cell cycle and apoptosis, oxaliplatin up-regulated p53 and BAX genes and down-regulated caspases 3 and 8. With the exception of Bcl-2 gene that was also up regulated by paraquat treatment, this treatment caused an inverse effect on p53 gene, which was down regulated, while caspases 3 and 8 genes were up regulated. Paraquat plus oxaliplatin treatment induced down-regulation of p53, BAX and caspase 8 gene. On the other hand, other genes did not change their expression pattern when compared to the control group. Porphyrin induced a higher up-regulation of all genes, except p53, which presented with expression similar to that of the control group. This pattern was not maintained when cells were concomitantly treated with porphyrin and oxaliplatin, as BAX gene was down regulated.

The effect on antioxidant gene modulation was also analyzed, and the findings revealed that, after 6 hours, oxaliplatin treatment caused up-regulation of SOD2 gene, whereas the remaining antioxidant genes were not affected by this treatment. Paraquat induced a reverse response on the SOD2 gene, which was down regulated in the presence of this drug. However, unlike oxaliplatin treatment, paraquat slightly up-regulated SOD1, CAT and GPX genes. Porphyrin caused higher up-regulation of the SOD1 gene and down-regulation of the SOD2 gene. CAT and GPX were also up regulated by this drug. Cells treated with a combination of paraquat and oxaliplatin also showed high up-regulation of the SOD1 gene and down-regulation of SOD2 and CAT genes. The GPX gene was slightly up regulated by this treatment. High SOD1 gene up-regulation was also observed in cells treated concomitantly with porphyrin and oxaliplatin. This treatment also slightly up-regulated SOD2 and GPX genes and down regulated the CAT gene.

4 Discussion

SOD2 is considered tumor suppressor gene in a large number of cancer cells. However, its effects on colorectal cancer appear to be reverse, since higher levels of SOD2 enzyme are found in tumors when compared to healthy tissues. As SOD2 is an antioxidant enzyme that participates in concatenate reactions in order to maintain superoxide anion levels at acceptable levels, the general role of superoxide-hydrogen peroxide imbalance in colorectal cancer cell biology needs to be clarified. For this reason, we designed an *in vitro* experiment to test the effect of high superoxide levels (by paraquat) or SOD2 levels (by porphyrin) on viability and proliferation of HT-29 colorectal cancer cells. In general, our results indicated that an increase in superoxide anion levels caused cytotoxic as well as apoptosis triggering.

We also observed an accentuated antiproliferative effect of paraquat, involving changes in cell cycle, especially interruption in the S phase. On the other hand, increased levels of SOD2-like molecules exhibited cytotoxic and antiproliferative effects, albeit less pronounced than those observed in cells exposed to high superoxide anion levels. These results suggest that, while HT-29 cells are sensitive to superoxide-hydrogen peroxide imbalance, this sensibility is highly accentuated when cells are exposed to high superoxide levels.

Available evidence indicates that cancer cells are generally under ROS stress. Thus, antioxidant enzymes such as SOD2 might play a critical role in carcinogenesis [19]. However, with respect to colorectal cancer cells, it cannot be presently ascertained that SOD2 imbalance alone could be responsible for tumor progression. In fact, our results suggest that colorectal cancer cells have a specific oxidative metabolism status involving superoxide-hydrogen peroxide balance. Moreover, when this status is changed by increasing superoxide or hydrogen peroxide levels (by increasing SOD2 levels), cytotoxic and antiproliferative events occur. Therefore, we can speculate that, in colorectal cancer, control of superoxide anions could be critical, whereby increased SOD2 levels could be a metabolic strategy employed by cancer cells in order to maintain their homeostasis and

proliferation rates. This premise is supported by previous studies, where the effect of an interference mRNA on SOD2 gene expression and colorectal cancer aggressiveness was investigated. In another study, the authors investigated the SNU-407 colorectal cell line, reporting that high hydrogen peroxide levels down-regulated tumor suppressor Runt-related transcription factor 3 (RUNX3) gene promoting the proliferation of these cells [11,20]. An investigation using T-84 colorectal cancer cell line also showed that oxidative stress caused by hydrogen peroxide down-regulated a candidate tumor suppressor gene intestine-specific transcription factor, caudal type homeobox-1 (CDX1), thus increasing cancer cell proliferation. The CDX1 down-regulation was abolished when cells were pretreated with N-acetylcysteine, which is a ROS scavenger molecule [21]. An epidemiological investigation recently performed by Naikaran and colleagues also highlighted the relevance of enzymatic antioxidant system in colorectal cancer biology. These authors analyzed gene and protein expression of antioxidant enzymes of 35 patients diagnosed with colorectal cancer and observed an important decrease in GPX levels in tumor tissue when compared to healthy tissues. In fact, in both situations, increased SOD2 levels and decreased GPX levels led to an increase of hydrogen peroxide concentrations in cells.

Our results also revealed that superoxide-hydrogen peroxide imbalance could modify the colorectal cancer cell sensitivity to oxaliplatin, a third-generation platinum compound that is currently used to treat colorectal cancer. The increase in superoxide levels caused by paraquat treatment improved the oxaliplatin cytotoxic effect, apoptosis induction, antiproliferative effect by increasing the frequency of the M/G2 phase cells after 24 hours, while increasing that of the S phase cells after 72 hours of treatment. In contrast, concomitant treatment with porphyrin and oxaliplatin decreased the cytotoxic effect of oxaliplatin (Figure 1A) and reduced the number of apoptosis events (Figure 1B). On the other hand, minimal concentration of porphyrin ($0.1 \mu\text{M}$), when combined with oxaliplatin, caused an increase in cell proliferation rate when compared to cells treated with oxaliplatin only (Figure 2).

Oxaliplatin is a compound that forms intra-strand links in the DNA molecule mainly between two adjacent guanine residues or a guanine and an adenine. These links are capable of disrupting DNA replication and

transcription [2, 23]. This direct effect on DNA molecules explains the changes in the cell cycle of colorectal cancer cells, causing arrest in the G2/M cell cycle and transient S phase delay in the HT-29 cells [24]. The cell cycle analysis showed that the increase in superoxide levels due paraquat treatment caused an important delay in the S phase and M/G2 phase after 24 hours of exposure, as well as S phase arrest after 72 hours of exposure in cells concomitantly treated with paraquat and oxaliplatin. On the other hand, the combination of porphyrin and oxaliplatin annulated the oxaliplatin effect on the cell cycle. These results suggest that cell oxidative status plays an important role in sensitivity to oxaliplatin.

This suggestion is according a previous investigation using peripheral blood mononuclear cells carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes that cause superoxide-hydrogen peroxide imbalance showed differential response when in vitro exposed to methotrexate (MTX) that use to some cancer treatments [15].

In the present investigation, we also evaluated the acute treatment effect on gene modulation related to cell proliferation, apoptosis and antioxidant enzymatic system. The results revealed highly heterogeneous response, with the exception of Bcl-2 gene, which was up-regulated by all treatments when compared to the untreated control group. In addition, only in the cells exposed to oxaliplatin up-regulation of p53 gene was noted. A functional p53 protein has been shown to be important for the cellular response to several propapoptotic factors, including chemotherapeutic drugs used in the treatment of colorectal cancer [25,26]. The study performed by Arango and colleagues also showed that oxaliplatin is able to increase the p53 levels in colorectal cells. This effect is probably related to promotion of intrinsic apoptosis via cell cycle arrest caused by oxaliplatin. However, presence of elevated superoxide levels seems to revert the induction of p53 gene over-expression in cells treated with oxaliplatin, although paraquat plus oxaliplatin also caused an important increase in apoptosis levels and cell arrest. As paraquat and porphyrin caused acute up-regulation of caspases 3 and 8, we cannot discard the possibility that the increase in superoxide levels activated the extrinsic apoptosis pathway. However, complementary investigations need to be performed to confirm this hypothesis.

Antioxidant genes of HT-29 colorectal cancer cells were also differentially modulated by oxaliplatin and other treatments. Paraquat and porphyrin treatments changed the antioxidant gene expression when compared to the control group, as up-regulation of SOD1, CAT and GPX genes and down-regulation of SOD2 gene was observed. These results indicated that colorectal cancer cells were very sensitive to oxidative status, presenting an acute gene response due to imbalances. The results yielded by gene expression analysis also suggest that oxaliplatin effect on antioxidant gene modulation is directly influenced by the cell oxidative status.

In conclusion, our findings suggest that superoxide-hydrogen peroxide imbalance is likely the main factor contributing to alterations in colorectal cancer cells, and that modulation of this balance can affect the sensitivity of these cells to chemotherapeutic response to oxaliplatin. As ROS has emerged as the key mediator of cellular oxidative stress, as well as redox dysregulation involved in cancer initiation and progression, this metabolism can be an important target for cancer treatment [27]. Our results are in line with this perspective and can contribute to better understanding and potential use of drugs that modulate ROS levels, especially hydrogen peroxide during colorectal chemotherapy treatment.

Acknowledgments

The authors thanks to CNPq (No 402325/2013-3; 490760/2013-9; 311446/2012-4), FAPERGS, FAPEAM and CAPES for grants and fellowships.

5 Reference

- [1] Kim A. Modulation of MnSOD in Cancer: Epidemiological and Experimental Evidence. *Toxicol Res* 2009; 26: 83-93.
- [2] Montagner G F F S, Sagrillo M, Machado M M, Almeida R C, Mostardeiro C P, Duarte M M M F, Cruz I B M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology in Vitro* 2010; 5:1410-1416.
- [3] Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 143-148.
- [4] Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem* 2015; 68: 87-130.
- [5] Oberley LW et al. Cell differentiation, aging and cancer: the possible roles of superoxide and superoxide dismutases. *Med Hypotheses* 1980; 6: 249-268.
- [6] Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NV, da Cruz IB, Sá G, Graudenz MS, et al. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathol Oncol Res* 2009; 15:19-24.
- [7] Bica CG, da Silva LL, Toscani NV, Zettler CG, Gottlieb MG, Alexandre CO, et al. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 196:153-158.
- [8] Janssen AM, Bosman CB, Kruidenier L, Griffioen G, Lamers CB, van Krieken JH, et al. Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125:327-335.
- [9] Nozoe T, Honda M, Inutsuka S, Yasuda M, Korenaga D. Significance of immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase as a marker of malignant potential in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10:39-43.
- [10] Mohr A, Büneker C, Gough RP, Zwacka RM. MnSOD protects colorectal cancer cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibition of Smac/DIABLO release. *Oncogene* 2008; 27:763-774.
- [11] Meng X1, Wu J, Pan C, Wang H, Ying X, Zhou Y, et al. Genetic and epigenetic down-regulation of microRNA-212 promotes colorectal tumor metastasis via dysregulation of MnSOD. *Gastroenterology* 2013;145:426-436.
- [12] Zhang Y, Gu J, Zhao L, He L, Qian W, Wang J, et al. Complete elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy. *Cancer Res* 2006; 66 :4291-4298.

- [13] Bus; Gibson, JE.. "Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity". Environmental Health Perspectives 1984; 55: 37–46.
- [14] Deferme L , Briedé J J, Claessen S M H, Cavill R, Kleinjans J C S. Cell line-specific oxidative stress in cellular toxicity: A toxicogenomics-based comparison between liver and colon cell models. Toxicology in Vitro 2015; 29: 845–855.
- [15] Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IB. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. PLoS One 2014; 9:107299.
- [16] Zhao X, Huang S, Luo H, Wan X, Gui Y, Li J, Wu D. Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. Int J Clin Exp Med 2014; 7:1204-1213.
- [17] William-Faltaos, D. Rouillard, P. Lechat, G. Bastian. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancercell lines. Anticancer Res 2006; 26:2093-2099.
- [18] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29:e45.
- [19] Hu Y, Rosen DG, Zhou Y. Mitochondrial manganese superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. J Biol Chem 2005; 280:39485–39492.
- [20] Kang KA, Kim KC, Bae SC, Hyun JW. Oxidative stress induces proliferation of colorectal cancer cells by inhibiting RUNX3 and activating the Akt signaling pathway. Int J Oncol 2013; 43:1511-1516.
- [21] Zhang R, Kang KA, Kim KC, Na SY, Chang WY, Kim GY, Kim HS, Hyun JW. Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. Gene 2013; 524:214-219.
- [2] Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, Nehme A. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. Cancer Res 1997; 57: 1841–1845.
- [23] Ceckova M, Vackova Z, Radilova H, Libra A, Buncek M, Staud F. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: Interference of EGFP. Toxicology in Vitro. 2008; 22:1846-1852.
- [24] William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G. Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells. Fundam Clin Pharmacol 2007; 21:165-172.

- [25] Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 2008; 282: 1497–1500.
- [26] Arango D, Corner GA, Wadler S, Catalano PJ, Augenlicht LH. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001; 61: 4910–4915.
- [27] Georg T. Wondrak: Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009;11: 3013–3069.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito do desbalanço farmacológico AS-HP na biologia das células de uma linhagem comercial de câncer colorretal (HT-29). Os resultados corroboraram a hipótese de que os níveis de superóxido e de peróxido de hidrogênio têm a capacidade de modular diferencialmente as células tumorais. Esta modulação envolveu um aumento nos níveis de ânion superóxido e foi capaz de causar citotoxicidade nas células HT-29, via indução de apoptose celular. Um efeito antiproliferativo acentuado também foi observado quando essas células, expostas ao ânion superóxido, foram tratadas com paraquat. Este efeito envolveu alterações no ciclo celular, especialmente interrupção na fase S.

Por outro lado, o aumento dos níveis de moléculas SOD2 pela exposição à porfirina, foram semelhantes às expostas ao paraquat. Entretanto, estes efeitos citotóxicos e antiproliferativos foram menos pronunciados do que o observado em células expostas a níveis elevados de ânion superóxido.

Estes resultados são bastante instigantes porque, apesar de existirem evidências de que a SOD2, que está diretamente associada ao balanço AS-HP, atue nas neoplasias malignas, tal atuação parece não ser universal. Ou seja, em alguns tipos de câncer, níveis elevados de SOD2 poderiam ter ação antitumoral e, em outros tipos, ação inversa. Por exemplo, a SOD2 é considerada um gene supressor tumoral em um grande número de células tumorais, como o estudo realizado recentemente por Margalit et al, (2015). Sugeriu a existência de uma associação entre três polimorfismos SOD2 (rs6917589, rs2758331 e rs4880) e aumento de mortalidade de pacientes com câncer de próstata ou que apresentavam metástases deste câncer. No entanto, outro estudo realizado por Duan et al, (2003), sugeriu que a SOD2 poderia ter um importante papel como gene supressor tumoral no câncer de próstata e poderia ser utilizado como terapia genética no tratamento do câncer de próstata.

Ao contrário do câncer de próstata, os efeitos da SOD2 sobre o câncer colorretal parecem ser inversos, uma vez que os níveis mais elevados de enzima SOD2 são encontrados em tumores quando comparados com tecidos saudáveis (PANI et al., 2000). Como SOD2 é uma enzima antioxidante, a qual mantém os níveis de ânion superóxido em níveis aceitáveis, o papel geral do desbalanço AS-HP na biologia celular do câncer colorretal precisa ser melhor estudado. Por esta razão, foi realizado um experimento *in vitro* para testar o efeito de níveis de

superóxido (por paraquat) e níveis SOD2 (por porfirina) sobre a viabilidade e a proliferação de células HT-29 de câncer colorretal.

A evidência disponível indica que as células tumorais são geralmente influenciadas pelo estresse oxidativo e produção de EROs. Assim, enzimas antioxidantes, como SOD2, podem desempenhar um papel crítico na carcinogênese (HU et al., 2005). No entanto, no que diz respeito a células de câncer colorretal, pode não ser verificado que o desequilíbrio da SOD2 por si só poderia ser responsável pela progressão do tumor.

Esta premissa é suportada por estudos anteriores, onde o efeito de interferência de um mRNA na expressão do gene SOD2 e agressividade do câncer colorretal, foi investigada. Em outro estudo, os autores investigaram a linhagem de células de câncer colorretal SNU-407, relatando que os níveis de peróxido de hidrogênio em alta regulou o fator 3 (RUNX3), gene de transcrição relacionado com Runt supressor de tumor, promovendo a proliferação destas células (MENG et al., 2013; KANG et al., 2013). Uma investigação usando T-84, outra linhagem de células de câncer colorretal, também mostrou que o estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio regula a proliferação de células cancerosas gene supressor de fator de transcrição específicos do tumor de intestino tipo caudal homeobox-1 (CDX1), aumentando assim, a sub-regulação CDX1 foi abolida quando as células foram pré- tratados com N-acetilcisteína, que é uma molécula sequestrante ERO (ZHANG et al., 2013).

Uma investigação epidemiológica recentemente realizada por Naikaran e colaboradores também destacou a relevância do sistema antioxidante enzimático na biologia do câncer colorretal. Estes autores analisaram a expressão do gene e da proteína de enzimas antioxidantes de 35 pacientes com diagnóstico de câncer colorretal e observaram uma diminuição importante nos níveis de GPX em tecido tumoral quando comparado a tecidos saudáveis. De fato, em ambas as situações, o aumento dos níveis de SOD2 e diminuição dos níveis de GPX, levou a um aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio nas células.

Além destas considerações sobre o efeito do balanço AS-HP na biologia do câncer colorretal, o presente estudo também corrobora a ideia de que cada tipo de câncer reage de modo diferencial a este desbalanço. Esta premissa se baseia no recente estudo realizado por Dal Berto et al, (2015), no qual os autores realizaram um ensaio experimental *in vitro*, a fim de investigar o efeito do

desbalanço AS-HP, via exposição ao paraquat e à porfirina sobre células DU-145, uma linhagem celular de câncer de próstata. Os resultados sugeriram que o desbalanço influenciou na proliferação destas células tumorais. Entretanto, uma maior redução da proliferação de células foi causada pela exposição à porfirina, e não pelo paraquat. Além disso, análise do ciclo celular por citometria de fluxo confirmou que porfirina era capaz de inibir o ciclo celular principalmente na fase S, assim como foi aqui observado em células expostas ao paraquat.

Portanto, os resultados indicam que, no câncer, o controle dos níveis do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio produzido a partir da ação da SOD2, pode ser crítico, ainda que a resposta a este desbalanço seja diferenciada conforme o tipo de neoplasia.

Especificamente falando do câncer colorretal, a criação de estratégias terapêuticas farmacológicas ou dietéticas que levassem ao aumento ou diminuição dos níveis de SOD2, poderia ser utilizada no tratamento da doença. Entretanto, esta hipótese precisará ser testada a partir da realização de estudos futuros.

Outro resultado bastante relevante descrito neste estudo foi relacionado ao efeito do desbalanço AS-HP na resposta tumoral ao quimioterápico oxaliplatina. Os resultados mostraram que o aumento nos níveis de superóxido, causado pelo tratamento com paraquat, melhorou o efeito citotóxico da oxaliplatina, induzindo à apoptose, um aumento no efeito antiproliferativo, aumentando a frequência das células em fase G2 / M, após 24 horas, enquanto que o aumento das células em fase S após 72 horas de tratamento. Em contraste, o tratamento concomitante com porfirina e oxaliplatina diminuiu o efeito citotóxico de oxaliplatina e reduziu o número de acontecimentos de apoptose. Por outro lado, a concentração mínima de porfirina (0,1 uM), quando combinada com oxaliplatina, causou um aumento na taxa de proliferação celular, quando comparadas com as células tratadas somente com oxaliplatina.

A oxaliplatina é um composto que forma ligações entre as cadeias da molécula de DNA, principalmente entre dois resíduos de guanina adjacentes ou uma guanina e uma adenina. Esses são capazes de interromper a replicação do DNA e transcrição (MONTAGNER et al., 2003; CECKOVA et al., 2008). Este efeito direto no DNA explica as alterações no ciclo celular de células de câncer colorretal, fazendo com que pare na fase M/G2 do ciclo celular e cause um

atraso de fase S em células HT-29 (WILLIAM et al., 2007). A análise do ciclo celular demonstrou um aumento na fase S e M/G2 após 24 horas de exposição das células, que obtiveram um aumento nos níveis de superóxido pelo tratamento com paraquat , bem como fase S parada após 72 horas de exposição em células concomitantemente tratadas com paraquat e oxaliplatina. Por outro lado, a combinação de porfirina e oxaliplatina anulou o efeito da oxaliplatina sobre o ciclo celular.

Assim, estes resultados sugerem que, em pacientes diagnosticados com câncer colorretal e que vão se submeter à quimioterapia por oxaliplatina, ou em pacientes com metástases, que também serão tratados com este fármaco, o controle dos níveis de peróxido de hidrogênio na célula pode ser critico.

No presente estudo, o efeito do tratamento com paraquat e porfirina na modulação do gene relacionado à proliferação celular, apoptose e sistema enzimático antioxidante também foi conduzido. Os resultados revelaram resposta altamente heterogênea, com a exceção do gene Bcl-2, o qual ocorreu um aumento da expressão por todos os tratamentos, quando comparado com o grupo controle.

Além disso, apenas nas células expostas à oxaliplatina, foi observado um aumento na expressão do gene p53. Este resultado é relevante, porque uma proteína p53 funcional parece ser importante para a resposta celular cancerosa a vários fatores, incluindo fatores pró apoptóticos e fármacos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer colorretal (BUNZ et al., 2008; ARANGO et al., 2001). O estudo realizado por Arango e colaboradores também mostrou que a oxaliplatina é capaz de aumentar os níveis de p53 nas células de câncer colorretal. Este efeito está provavelmente relacionado com a promoção da apoptose intrínseca via parada do ciclo celular causada pela oxaliplatina.

Por outro lado, a presença de níveis elevados de superóxido pareceu reverter a super expressão do gene p53 em células tratadas com oxaliplatina e paraquat, que apresentaram um aumento importante nos níveis de apoptose celular. Como paraquat e porfirina causaram aumento da expressão do gene das caspases 3 e 8, não se pode descartar a possibilidade de que o aumento nos níveis de superóxido ativa a via de apoptose extrínseca. No entanto, investigações complementares também devem ser realizadas para confirmar esta hipótese.

Genes antioxidantes de células de câncer colorretal HT-29 foram também modulados pela exposição ao paraquat e à porfirina e ao tratamento com a oxaliplatina. Paraquat e porfirina modularam a expressão de genes antioxidantes, quando comparados com o grupo controle, ocorrendo super expressão dos genes SOD1, CAT e GPX e diminuição da expressão do gene da SOD2. Estes resultados indicaram que as células de câncer colorretal são muito sensíveis ao estresse oxidativo, ocorrendo uma resposta gene aguda quando as células são expostas a estes compostos. Os resultados gerados a partir da análise de expressão gênica também sugeriram que, a oxaliplatina teria efeito sobre a modulação dos genes antioxidantes. Entretanto, o papel desta modulação no mecanismo causal antitumoral deste quimioterápico permanece para ser elucidado.

Em síntese, apesar da existência de limitações metodológicas relacionadas principalmente aos estudos *in vitro*, resultados aqui descritos sugerem que o desbalanço AS-HP é provavelmente um fator importante, que contribui para a ocorrência de alterações das células do câncer colorretal. Os resultados também sugerem que a modulação deste balanço poderia aumentar a sensibilidade destas células à exposição ao quimioterápico oxaliplatina.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito do desbalanço farmacológico AS-HP na viabilidade, taxa de proliferação celular, na resposta ao quimioterápico oxaliplatina e modulação da expressão de genes do ciclo celular, apoptose e metabolismo oxidativo em células de câncer colorretal da linhagem comercial HT-29 e os resultados mostraram que:

- tanto a exposição ao paraquat quanto à porfirina foram citotóxicas para as células de câncer colorretal, ainda que este efeito tenha sido mais pronunciado nas células expostas aos níveis mais elevados de superóxido gerados pelo paraquat;

- ambas exposições também causaram diminuição na proliferação celular. No caso, a exposição ao paraquat causou um aumento de células que interromperam o seu ciclo na fase S;

- a responsividade à oxaliplatina também foi afetada pelos níveis elevados de superóxido, causados pelo paraquat, e de peróxido de hidrogênio, causados pela porfirina. Estes resultados sugeriram que o desbalanço AS-HP tem um papel na resistência das células de câncer colorretal HT-29 à oxaliplatina;

- o desbalanço AS-HP também envolveu uma resposta gênica diferenciada, observada a partir da modulação diferencial da expressão de genes relacionados ao ciclo celular, apoptose e metabolismo antioxidante.

Os resultados sugerem que o manejo do desbalanço AS-HP poderia ser uma estratégia terapêutica farmacológica ou dietética para potencializar o tratamento de pacientes com câncer colorretal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol.** v.3, p.28, 2005.
- ALBERTS, B., et al. **Biologia molecular da célula.** 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463 p.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal cancer and facts & figures - special edition 2008-2010.** Atlanta, 2008.
- ARANGO, D., et al. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. **Cancer Res.** v. 61, p. 4910–4915, 2001.
- BAG, A.; BAG, N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.** v.17, p.3298, 2008.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Res.** v.10, p. 215-223, 2007.
- BATINIC-HABERLE, I., et al. Lipophilicity is a critical parameter that dominates the efficacy of metalloporphyrins in blocking the development of morphine antinociceptive tolerance through peroxynitrite-mediated pathways. **Free Radic Biol Med.** v.46, p. 212-219,2009.
- BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential. **Antioxid. Redox Sign.** v. 13, p. 877-918, 2010.
- BATINIĆ-HARBELE, I., et al. Diverse functions of cationic Mn(III) N-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics. **Free Rad. Bio. Med.** v. 51, p. 1035-1053, 2011.
- BATINIĆ-HARBELE, I., et al. SOD Therapeutics: Latest Insights into Their Structure-Activity Relationships and Impact on the Cellular Redox-Based Signaling Pathways. **Antioxid. Redox Sign.**v.1, p. 1-44, 2013.
- BELLÓ, A. Dano Oxidativo e Regulação Biologica pelos Radicais Livres. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes.** 1. ed. Porto Alegre: Ulbra., 2002.p.15-19.
- BICA, C.G., et al. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. **Pathol Oncol Res.** v. 15, p. 19-24, 2009.

BOSMAN, F.; YAN,P. Molecular pathology of **colorectal cancer**. *Pol J Pathol.* v. 65, n.4, p. 257-266, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do intestino**. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2003. 36 p.

BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**. v. 47, n. 10, p. 781-792, 2013.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microssomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymol.** v. 52, p.302-310, 1978.

BUNZ, F., et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. **Science**. v. 282, p. 1497-1500, 2008.

CAMPOS, F.G.C.M.; HABR-GAMA, A. Embriologia e anatomia cirúrgica do cólon. In: PINOTTI, H.W. **Tratado de Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo**.1.ed. São Paulo: Atheneu, 1994, v.2, p. 1059-1063.

CARDUS, M. A. et al. Pharmacogenomic approach for identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. **Mol Cancer Ther.** v. 8, n. 1, p. 194-202, 2009.

CECKOVA, M., et al. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: Interference of EGFP. **Toxicology in Vitro**. v. 22, p. 1846-1852, 2008.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. **Mutation research/reviews in mutation research**. v. 681, n. 1, p. 51-67, 2009.

CERUTTI, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science**. v. 227, p. 375 – 381, 1985.

CRUZ, G. M. G. et al. Epidemiology, Diagnosis, Staging and Graduation of Colon Cancer in 490 Patients. **Rev bras Coloproct.** v.27, n.2, p.139-153, 2007.

CULLEN, J. J., et al. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Res.** v. 63, p. 1297–1303, 2003.

DAL BERTO, M., et al. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. **Med Oncol.** v. 32, p. 1-10, 2015.

DASHWOOD, R. H. Early detection and prevention of colorectal cancer. **Oncol Rep.** v. 6, p.277-281,1999.

DE FREITAS-SILVA, G. ; REBOUÇAS, J. S. ; SPASOJEVIC, I. ; BENOV, L.; IDEMORI, Y. M.; BATINIC-HABERLE, I. SOD-like activity of Mn(II) beta-octabromo-meso-tetrakis(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin equals that of the enzyme itself. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 477, p. 105-112, 2008.

DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proc R Soc Lond B.** v.276, p.1737-1745, 2009.

DI FRANCIA, R., et al. Current strategies to minimize toxicity of oxaliplatin: selection of pharmacogenomic panel tests. **Anticancer Drugs.** v. 10, p. 1069-1078, 2013.

DUAN, H. et al. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. **Antiox Redox Signal.** v. 5, p. 677– 688, 2003.

DUSSE, L.M.; VIERA,L.M.; CARVALHO,M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Pat Med Laborat.*v. 39, n.4, p.343-350, 2003.

EICHER, T.; HAUPTMANN, S. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications. 2. Ed: Wiley-VCH, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras.** v.43, p.1-16, 1997.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular.** São Paulo: Atheneu, 2004.

FITO, M. L. A., et al. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. **Ann Inst Super Sanita.** v. 43, p. 375-381, 2007.

FRIEDENREICH, C. M. Physical activity and cancer prevention:from observational to intervention research. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.** v. 10, p. 287-301, 2001.

GOLDSTEIN, D.A., et al. Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review of the Value of Current Therapies. **Clin Colorectal Cancer.** v. 10, p.1-6, 2015.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions.** v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HERR, G. E., et al. Avaliação de Conhecimentos acerca da Doença Oncológica e Práticas de Cuidado com a Saúde. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 59, p. 33-41, 2012.

HUANG K, LIN. S. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. **Nature.** v.407, p. 390-395, 2000.

HU,Y.; ROSEN, D.G.; ZHOU, Y. Mitochondrial manganese superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. **J Biol Chem.** v.280, p. 39485-39492, 2005.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2013. 98 p.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015. 98 p.

KASZTELAN, S.B.; CICHOZ,L.H.; SŁOMKA, M. Colorectal cancer as a health care problem: evaluation of the current diagnostic options. **Pol Arch Med Wewn.** V.118, n.4, p. 224-227, 2008.

KIM, Y. et al., An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAILinduced apoptosis. **J Biol Chem.** v. 277, p. 22320–22329, 2002.

KOOLMAN, J.; RÖHM, K.H. **Bioquímica, texto e atlas.** 3. ed. São Paulo: Artmed, 2005. 6-29. p.

KANG, K.A., et al. Oxidative stress induces proliferation of colorectal cancer cells by inhibiting RUNX3 and activating the Akt signaling pathway. **Int J Oncol.** v. 43, p. 1511-1516, 2013.

LEITE, L.E.A., et al. Envelhecimento, estresse oxidativo e sarcopenia: uma abordagem sistêmica. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia.** v.15, n.2, p. 365-380, 2012.

LESLIE, A.; STEELE, R.J. Management of colorectal cancer. **Postgrad Med J.** v.78, p. 473-478, 2002.

LEWIS, R., et al. Management of colorectal cancers. **Qual Saf Health Care.** v. 13, p. 400-4004, 2004.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics.** v. 11, n. 4, p. 376-81, 1995.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2006.

MARGALIT, D.N., et al. Germ line variation in superoxide dismutase-2 (SOD2) and survival outcomes after radiation therapy for prostate cancer: results of a test and validation set analysis. **Clin Genitourin Cancer.** v.13, n.4, p. 340-377, 2015.

MARIANI, F.; SENA ,P.; RONCUCCI L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. **World J Gastroenterol.** v. 20, n.29,p.9716-9731, 2014.

MATHEW, A. et al. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. **Int J Colorectal Dis.** v. 19, p. 23-42, 2004.

MAYER, R.J. Gastrointestinal Tract Cancer. In: KASPER, D.L; BRAUNWALD, E; FAUCI, A.S; HAUSER, S.L; LONGO, D.L; JAMESON, J.L; LOSCALZO, J (editors). **Harrison's principles of internal medicine.** 17. ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2008. p. 570-580.

MENG, X., et al. Genetic and epigenetic down-regulation of microRNA-212 promotes colorectal tumor metastasis via dysregulation of MnSOD. **Gastroenterology.** v.145, p. 426-436, 2013.

MILGROM, L. R. The Colours of Life: An introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. Oxford: Oxford University Press, 1997, p. 249.

MONTAGNER, G. F. F. S., et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro.** v. 5, p. 1410-1416, 2010.

NETO, J.D. et al. Câncer colorretal: características clínicas e anatomo-patológicas em pacientes com idade inferior a 40 anos. **Rev. Bras. Coloproct.** v.26, p.430-435, 2006.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Radic Biol Med.** v.31, p.1287-1312, 2001.

NICCO, A.J., et al. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic, mangafodipir. **J Natl Cancer Inst .** v. 98, p. 236–244, 2006.

OBERLEY, L.W., et al. Cell differentiation, aging and cancer: the possible roles of superoxide and superoxide dismutases. **Med Hypotheses.** v. 6, p. 249-68, 1980.

OLIVEIRA, M. Arma a laser contra o câncer. **Rev. Pesquisa Fapesp,** 74. ed., 2002. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2002/04/01/arma-a-laser-contra-ocancer/>>. Acesso em 13 de dezembro de 2016.

PALMA, S., et al. From Molecular Biology to Clinical Trials: Toward Personalized Colorectal Cancer Therapy. **Clin Colorectal Cancer.** v.11, p. 1-12 , 2015.

PALOZZA, P., et al. Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase (tlcy-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Nutrition.** v. 102, n. 2, p. 207-214, 2009.

PANCZYK, M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. **World J Gastroenterol.** v. 20, n.29, p.9775-9827, 2014.

PANI, G., et al. Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. **Cancer Res.** v. 60, p. 4654–4660, 2000.

PERON, A. P., et al. Ação tóxica do herbicida paraquat sobre o homem. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR.** v. 7, n. 3, 2003.

PETERS, U. Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial Project Team Dietary fiber and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. **Lancet.** v. 361, p. 1491-1495, 2003.

PIANTÁ, C. D. **Influência do polimorfismo do superóxido dismutase dependente de manganês 2 na morbi-mortalidade pós-operatória de pacientes submetidos a cirurgias oncológicas.** Dissertação (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde)- Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 21, p. 111-127, 2007.

ROYNETTE, C., et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition.** v.23, p.139–151, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant physiol.** v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Intoxicação por Paraquat. **Acta Médica Portuguesa.**v. 16, p. 25-32, 2003.

SERVEI, C.L.S. Institut Català d'Oncologia. **El càncer de còlon i recte - informació per a dones i homes afectats.** Barcelona, 2000. 36 p.

SUTTON, A., et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenetics and Genomics.** v.15, n. 5, p. 311-319, 2005.

TEMRAZ, S., et al. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. **Oncology/Hematology.** v. 89, p. 217–230, 2014.

TOVMASYAN, A.; REBOUÇAS, J.S.; BENOV, L. Simple Biological Systems for Assessing the Activity of Superoxide Dismutase Mimics. **Antioxid. & redox sign.** v. 20, p. 2416-2436, 2014.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine.** v.33, n. 3, p.337-349, 2002.

ZHANG, Y., et al. Complete elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy. **Cancer Research.** v. 15, p. 4291-4298, 2006.

ZHANG, R., et al. Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. **Gene.** v. 2, p. 25-524, 2013.

ZHAO, X., et al. Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. **Int J Clin Exp Med.** v. 7,p. 1204-13, 2014.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science.** v. 283, p. 1482-1488, 1999.

WILLIAM-FALTAOS, S., et al. Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 21, p.165-172, 2007.

ANEXO 1



Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response



Verônica Farina Azzolin ^a, Francine Carla Cadoná ^b, Alencar Kolinski Machado ^a, Maiquidieli Dal Berto ^d, Fernanda Barbisan ^a, Eduardo Bortoluzzi Dornelles ^b, Werner Giehl Glanzner ^c, Paulo Bayard Gonçalves ^c, Claudia Giugliano Bica ^d, Ivana Beatrice Mânicia da Cruz ^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c BIOREP Lab, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2015

Received in revised form 30 November 2015

Accepted 2 December 2015

Available online 8 December 2015

Keywords:

Superoxide dismutase manganese dependent
Porphyrin
Paraquat
HT-29 colorectal cell
Chemotherapy

ABSTRACT

The role of superoxide dismutase manganese dependent enzyme (SOD2) in colorectal cancer is presently insufficiently understood. Some studies suggest that high SOD2 levels found in cancer tissues are associated with cancer progression. However, thus far, the role of colorectal cancer superoxide-hydrogen peroxide imbalance has not yet been studied. Thus, in order to address this gap in extant literature, we performed an in vitro analysis using HT-29 colorectal cell line exposed to paraquat, which generates high superoxide levels, and porphyrin, a SOD2 mimic molecule. The effect of these drugs on colorectal cancer cell response to oxaliplatin was evaluated. At 0.1 μM concentration, both drugs exhibited cytotoxic and antiproliferative effect on colorectal cancer cells. However, this effect was more pronounced in cells exposed to paraquat. Paraquat also augmented the oxaliplatin cytotoxic and antiproliferative effects by increasing the number of apoptosis events, thus causing the cell cycle arrest in the S and M/G2 phases. The treatments were also able to differentially modulate genes related to apoptosis, cell proliferation and antioxidant enzyme system. However, the effects were highly variable and the results obtained were inconclusive. Nonetheless, our findings support the hypothesis that imbalance caused by increased hydrogen peroxide levels could be beneficial to cancer cell biology. Therefore, the use of therapeutic strategies to decrease hydrogen peroxide levels mainly during oxaliplatin chemotherapy could be clinically important to the outcomes of colorectal cancer treatment.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biological role of superoxide dismutase manganese dependent enzyme (MnSOD/SOD2) in healthy cell metabolism is undisputable since, under oxidative stress conditions, this enzyme is considered as the first line of mitochondrial defense against oxidative damages by removing excessive superoxide anion (Kim, 2009; Montagner et al., 2010). However, the role of SOD2 cancer cells is not completely understood, and several conflicting results have been published in the literature including genetic investigations of some polymorphism such as Val16Ala-SOD2 (Oberley, 2005; Bresciani et al., 2015). In the first studies involving SOD2 and cancer performed during the 70s, Oberley and Buettnner proposed that SOD2 could be a tumoral suppressor molecule (Oberley et al., 1980). However, contrary evidence reinforced the dual nature of SOD2 in tumor development and progression, depending

on cancer type and stage. In some cases, such as breast cancer, high levels of SOD2 genetically determined an increased risk of cancer development, whereas low SOD2 levels were found to stimulate the metastasis occurrence (Bica et al., 2009, 2010).

In colorectal cancer in particular, controversial results related to SOD2 enzyme have been reported. An investigation conducted by Janssen and colleagues showed that colorectal tumor tissues present up to four times more SOD2 than normal mucosa (Janssen et al., 1999). A more recent study conducted by Nozoe et al. revealed that high SOD2 content was associated with colorectal lymph node metastasis and with poor 5-year overall survival (Nozoe et al., 2003). Supporting these findings, some causal mechanisms associated with high SOD2 levels and colorectal cancer development and metastasis have been reported since. Authors that examined causal mechanisms suggested that SOD2 could induce the colorectal cancer surveillance by apoptosis inhibition from down-regulation of molecules, such as factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Mohr et al., 2008). In addition, SOD2 overexpression caused by down-regulation of microRNA-212 has been related to colorectal tumor metastasis (Meng

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I.B.M. da Cruz).

et al., 2013). On the other hand, a study performed by Zhang and colleagues pointed toward a strong antitumoral effect in cells with SOD2-TRAIL genes obtained from a replication-competent recombinant adenovirus with E1B 55-kDa gene deletion (ZD55). According to the authors, the overexpression of SOD2-TRAIL genes promoted tumor suppression, as production of hydrogen peroxide derived from SOD2 activated caspase-8 triggering apoptosis events (Zhang et al., 2006).

These results make understanding of the role of SOD2 in colorectal cancer biology very difficult. As SOD2 continually dismutates superoxide anion in hydrogen peroxide, it is likely that the imbalance of this reaction could be the main factor in colorectal cancer regulation, and not just SOD2 enzyme regulation. This assumption is corroborate by a recent study that suggest that glutathione peroxide 1 gene (GPX1) may play a critical role in the development of colorectal cancer (Bus and Gibson, 1984; Deferme et al., 2015). In this case, evaluation of the superoxide-hydrogen imbalance effects on colorectal cancer using pharmacological drugs can be considered relevant. Therefore, we performed an *in vitro* analysis using HT-29 colorectal cell line exposed to two drugs (paraquat and porphyrin) that induce superoxide-hydrogen peroxide imbalance. Paraquat is an organic compound that interferes with electron transfer through the reduction in the number of donor electrons, such as NADPH in the mitochondria, increasing the superoxide anion levels. On the other hand, porphyrin is a SOD2 mimic molecule that increases the rate conversion of superoxide anion in hydrogen peroxide (Zhang et al., 2006; Bus and Gibson, 1984). We also tested the effect of this imbalance on the colorectal cell response to oxaliplatin chemotherapeutic drug in order to determine whether superoxide-hydrogen peroxide imbalance plays a role in cancer drug resistance.

2. Materials and methods

An *in vitro* investigation using human cancer colorectal HT-29 cell line (ATCC HTB38 – Rio de Janeiro Cell Bank, RJCB 0111, Brazil) was performed in controlled conditions. Cells were exposed to paraquat and porphyrin in order to generate a superoxide and hydrogen peroxide imbalance. Its effect on viability, apoptosis induction, cell proliferation, cell cycle modulation and expression of antioxidant and apoptotic genes was subsequently evaluated. The influence of this imbalance on oxaliplatin effect on HT-29 cells was concomitantly analyzed in our protocols.

2.1. Cell culture conditions

The cell cancer line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. Cell suspension was placed in each of 96-well plates (2.5×10^5 cells/well). After cell attachment, the cultures were treated with paraquat, porphyrin and oxaliplatin. Further, the cells were incubated at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 and 72 h in order to produce the assays.

2.2. Viability and cell proliferation assay

The HT-29 viability and cellular proliferation were initially evaluated by MTT Assay. The supernatant of the treatments was removed and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M; pH 7.4). The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in a 5 mg/mL PBS added into a 96-well plate containing the sample treatments and was incubated for 1 h at 37 °C. Next, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200 µL of DMSO (dimethyl sulfoxide). The absorbance at 560 nm was read in the fluorimeter (Barbisan et al., 2014).

2.3. Apoptosis and cell cycle assays by flow cytometry

Complementary analyses of flow cytometry were performed to confirm the treatment cytotoxicity using Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™). Annexin-V-FITC can detect early apoptotic process, whereas PI allows identifying late or necrotic apoptotic cells. The detection is realized through the bond the cell receptors form with these fluorescents antibodies, Annexin-V and PI. The analysis was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 1×10^6 cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM and were incubated for 24 h. Following incubation, the cells were trypsinized in order to ensure that they are detached and were washed twice with cold PBS before being resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. After transferring the cells into 100 µL of the solution (1×10^5 cells), the contents were placed into a 5 mL culture tube. The resuspended cells were subjected to gentle vortex and were stained with 5 µL of Annexin-V-FITC and 5 µL of PI. Following a short incubation (15 min) in the dark at room temperature, 400 µL of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications (Zhao et al., 2014).

The cell cycle analysis (William-Faltao et al., 2006) was also performed using flow cytometry after 24 h and 72 h of HT-29 prior to being treated with paraquat, porphyrin and oxaliplatin. The PI reagent binds to the DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. PI also binds to RNA, necessitating treatment with nucleases to distinguish between RNA and DNA staining. In our work, cells were seeded in 6-well plates at 5×10^4 cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM and were incubated for 24 and 72 h. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol. Further cells were stored at –20 °C overnight. Prior to conducting analyses, the cells were centrifuged and washed once with PBS, before being resuspended in 500 µL PI-solution in PBS: 50 µg/mL PI from 50 × stock solution (2.5 mg/mL) 0.1 mg/mL RNase A 0.05% Triton X-100 and incubated for 40 min at 37 °C. Finally, 3 mL of PBS was added for washing and was resuspended in 500 µL PBS for flow analysis.

2.4. Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was extracted using Trizol, following manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The extracted RNA was measured by Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer at the 532 nm wavelength. For realizing the reverse transcription, RNA was used, whereby the samples of RNA (1 µg/mL) were added to 0.2 µL of DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 5 min, followed by heating at 65 °C for 10 min. The cDNA was generated with 1 µL of iScript cDNA and 4 µL of Mix iScript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The reaction consisted of the following steps: heating at 25 °C for 5 min, at 42 °C for 30 min, and at 85 °C for 5 min, followed by incubation at 5 °C for 60 min. qRT-PCR was realized in the Passo One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) with SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The reactions of each sample were made in triplicate, using 0.5 µM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the final volume of 15 µL. The Beta-acting gene played the housekeeping role (Pfaffl, 2001). The characteristics of the primers used are presented in the (Table 1).

2.5. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation (SD). All experiments were replicated three times. To perform the statistical analysis we used mean ± standard error of each independent experiment.

Table 1
Gene primers list.

Genes	Primers	
	Sense	Antisense
β actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGGCGAAGTTAGGTTTGTC
CAT	GATAGCCTTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTCAAGGAT
SOD 1	GCACACTGGTGCATGAA	ACACCAAGCCAAACGACTT
SOD 2	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
GPx	GGTTTCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT
BAX	CCCTTCTACTTGCAGCAA	CCCGAGGAAGTCCAATGT
BCL-2	GAGGATTGCGCCCTCTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCATGT
CASPASE 8	AAGGAGCTCTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT
CASPASE 3	TTTGAGCTGACAGAGACATG	TACCACTGCATGGAGAAATGG
p53	TTGGTCTTGACCCCTGCT	GTGCAGGCCAACTTGTTCAGT

Abbreviations:

CAT – Catalase.

SOD1 – Superoxide dismutase 1.

SOD 2 – Superoxide dismutase 2.

GPx – Glutathione peroxidase.

To calculate means of each treatment, outlier's data from repeated wells with variation more than 20% around means were excluded since clearly represented experimental errors. The results pertaining to viability and antiproliferative effect of paraquat, porphyrin and oxaliplatin were expressed as a percent (%) of control group. Therefore, the data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Dunnett Test. The statistical tests were performed using Graph Pad Prism Software.

3. Results

3.1. Effects on viability and apoptosis

Initially, we determined the effect of several paraquat and porphyrin concentrations on the viability of colorectal cells. The findings revealed that all paraquat and porphyrin concentrations (0.1, 1, 3 and 5 μ M) tested here caused significant mortality when compared to the control group ($p = 0.001$). As the paraquat and porphyrin mortality effect

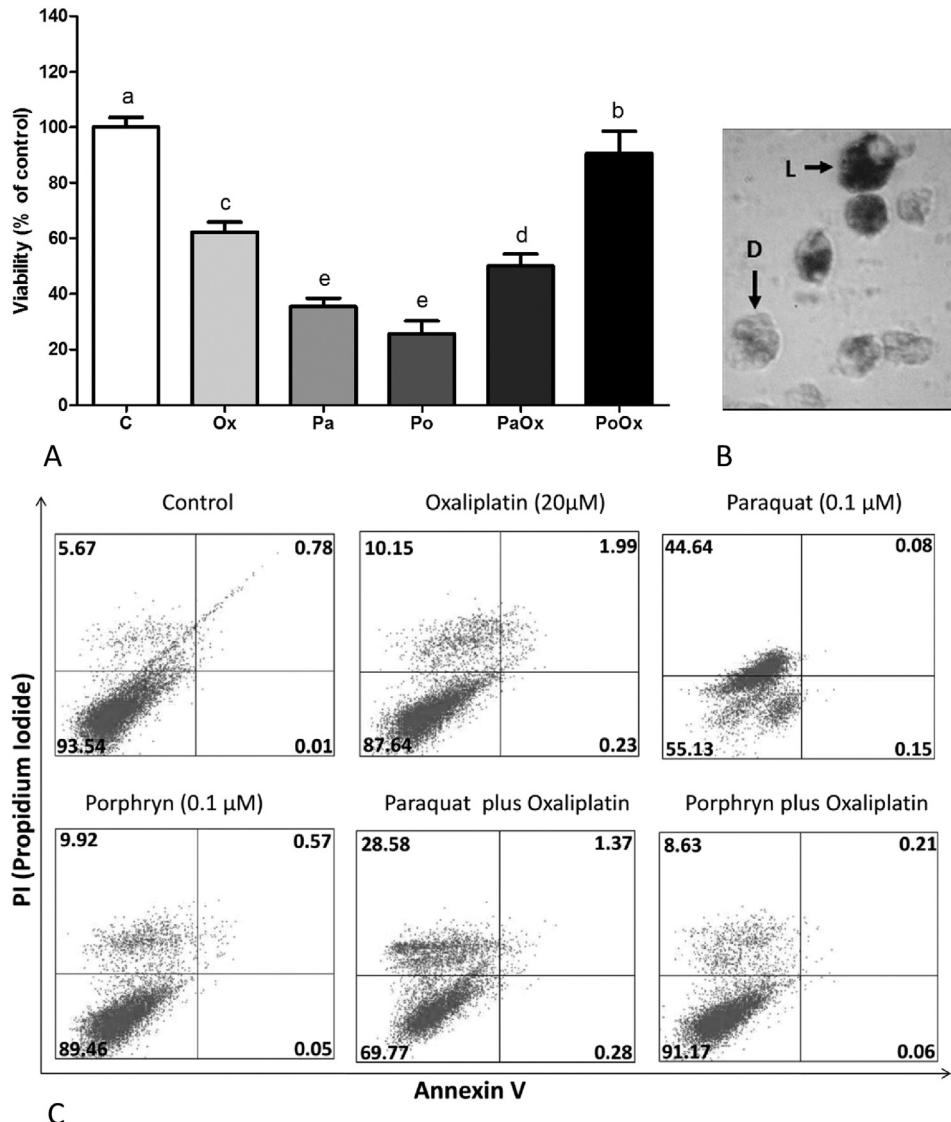


Fig. 1. Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell line viability after 24 h cultures. (A) Viable cells frequency determined by MTT spectrophotometric assay. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$). Data are shown as % of untreated control group; (B) Live (L) and dying (D) cells during MTT assay reaction; (C) Flow cytometry analysis with propidium iodide (PI) and Annexin V to evaluate the influence of treatments on necrosis and apoptosis induction. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

was higher than that of oxaliplatin ($20 \mu\text{M}$), we chose to perform the remaining tests using the minimal concentration ($0.1 \mu\text{M}$) of these drugs, in order to match their cytotoxicity to that caused by oxaliplatin. The results showed that, in isolation, both drugs caused higher mortality. However, in the presence of oxaliplatin, a significant decrease in mortality was observed, especially when paraquat was combined with porphyrin (Fig. 1A,B).

We performed additional tests to establish whether the toxic effects of paraquat and porphyrin involved necrosis or apoptosis pathways. In relation to the control group (treated as 100%), all treatments increased the number of cells that underwent necrosis. However, the effect was most pronounced in cells treated with paraquat alone (44.6%) or paraquat combined with oxaliplatin (28.6%). The frequency of apoptosis events (early + late apoptosis) was significantly increased in cells treated with oxaliplatin (281.1% in relation to the control), as well as in cells exposed to paraquat (130.4% in relation to the control) and in cells treated with paraquat combined with oxaliplatin (208.9% in relation to the control).

In contrast, porphyrin significantly reduced the apoptosis frequency (78.5%) when compared to the control group. This reduction was more accentuated when cells were concomitantly exposed to porphyrin and oxaliplatin (34.2% in relation to the control group) (Fig. 1C).

3.2. Effects of paraquat and porphyrin on cell proliferation

Colorectal cancer cells were exposed to different concentrations of paraquat and oxaliplatin with and without porphyrin and the results are presented in (Fig. 2). Both paraquat and porphyrin significantly decreased the cell proliferation after 72 h in culture when compared to the control group ($p = 0.0001$). However, this effect was more pronounced in paraquat treatment relative to porphyrin. In cells treated with oxaliplatin, the concomitant exposure to paraquat decreased the cell proliferation rate even further. However, at almost all concentrations tested here, porphyrin did not change the proliferation rate of cells exposed to oxaliplatin.

3.3. Effects of paraquat and porphyrin on cell cycle

The potential paraquat and porphyrin effects on cell cycle after 24 and 72 h exposure were also investigated by subjecting HT-29 colorectal cancer cells to two types of analysis. Firstly, changes in cell cycle between 24 and 72 h time points were evaluated separately for each

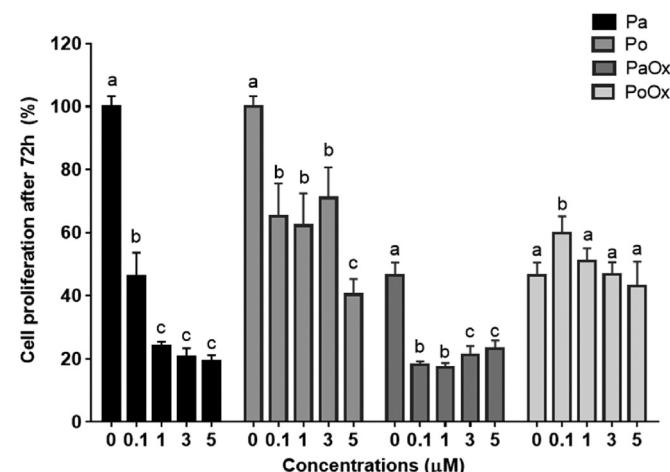


Fig. 2. Effect of different concentrations of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell proliferation after 72 h determined by MTT spectrophotometric assay. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$); Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

treatment type. Next, the frequency of cells in each cycle was compared to the control group after 24 and 72 h of exposure.

In the control group, when the cell cycle changes were examined between the 24 and 72 h time points, an increase of 19% in the G1 phase cells, as well as a decrease of 10% in the S and 8% in the M/G2 cells was noted. Oxaliplatin treatment changed this pattern, as a slight increase in S (9%) and M/G2 cells (5%) was observed, when compared to the values obtained at 24 h, indicating cell cycle interruption. Paraquat treatment did not result in any differences in the cell cycle after 24 h of exposure when compared to the control group. However, after 72 h, S phase cells remained elevated (Fig. 3).

The increase in the number of G1 cells after 72 h was also lower than in the control when cells were treated with paraquat (5%). However, the porphyrin presented similar cell cycle pattern to that observed in the control group. The paraquat plus oxaliplatin treatment produced more diverse changes in cell cycle after 24 h of treatment, whereby higher levels of cells in the S and M/G2 phase were observed when compared to the control group. After 72 h, this effect was not as pronounced despite the frequency of S and M/G2 cells being higher than in the control group. On the other hand, when cells were treated with oxaliplatin plus porphyrin, the cell cycle pattern did not change at 24 and 72 h time points ($p = 0.430$). In contrast, when administered in isolation, exposure to porphyrin did not significantly change the cell cycle when compared to the control group. On the other hand, the treatment with paraquat plus oxaliplatin resulted in extensive changes in the cell cycle pattern. After 24 h, was observed a significant reduction in the G1 cells, along with an increase in the M/G2 cells, when compared to the control group. After 24 h, while the number of G1 cells increased, the frequency of the S phase cells remained higher than in the control and in the sample treated with oxaliplatin only. Similar effects were observed in cells treated with porphyrin plus oxaliplatin.

In the second cell cycle analysis, the frequency of cells in each cell cycle phase was compared to the control group (Fig. 4). When compared to control group, after 24 h of oxaliplatin treatment, the frequency of G1 cells significantly increased. This result was also observed in cells treated with oxaliplatin plus porphyrin.

However, treatments with paraquat alone, as well as combined with oxaliplatin, produced inverse results, as the frequency of G1 cells decreased after 24 h of exposure. Porphyrin treatment did not change the G1 frequency when compared to the control group. All treatments significantly decreased the frequency of the S phase cells when compared to the control group. When subjected to oxaliplatin treatment, the frequency of M/G2 cells was lower than that observed for paraquat treatments (with and without oxaliplatin). In cells treated with porphyrin (with and without oxaliplatin), this phase was also similar to the control. After 72 h, with the exception of porphyrin (which did not change the cell cycle when compared to the control group), all other treatments significantly decreased the frequency of G1 cells when compared to the control group. Paraquat with and without oxaliplatin, as well as porphyrin plus oxaliplatin, increased frequency of the S phase cells. In addition, the frequency of cells in M/G2 phase was similar to the control group, with the exception of cells treated with oxaliplatin only, or those treated with porphyrin plus oxaliplatin.

3.4. Acute effects of paraquat and porphyrin on gene modulation

Given that paraquat and porphyrin cause cell oxidative imbalance, we performed a complementary analysis to evaluate the acute effects of the exposure to these drugs on the modulation of expression of nine genes related to cell cycle, apoptosis and antioxidant enzymes (Fig. 5). This analysis was performed after 6 h exposure to all treatments. The results revealed a heterogeneous pattern of gene regulation according to each treatment, indicating that genes studied here are very sensitive to the cell oxidative status.

In relation to genes associated with cell cycle and apoptosis, oxaliplatin up-regulated p53 and BAX genes and down-regulated

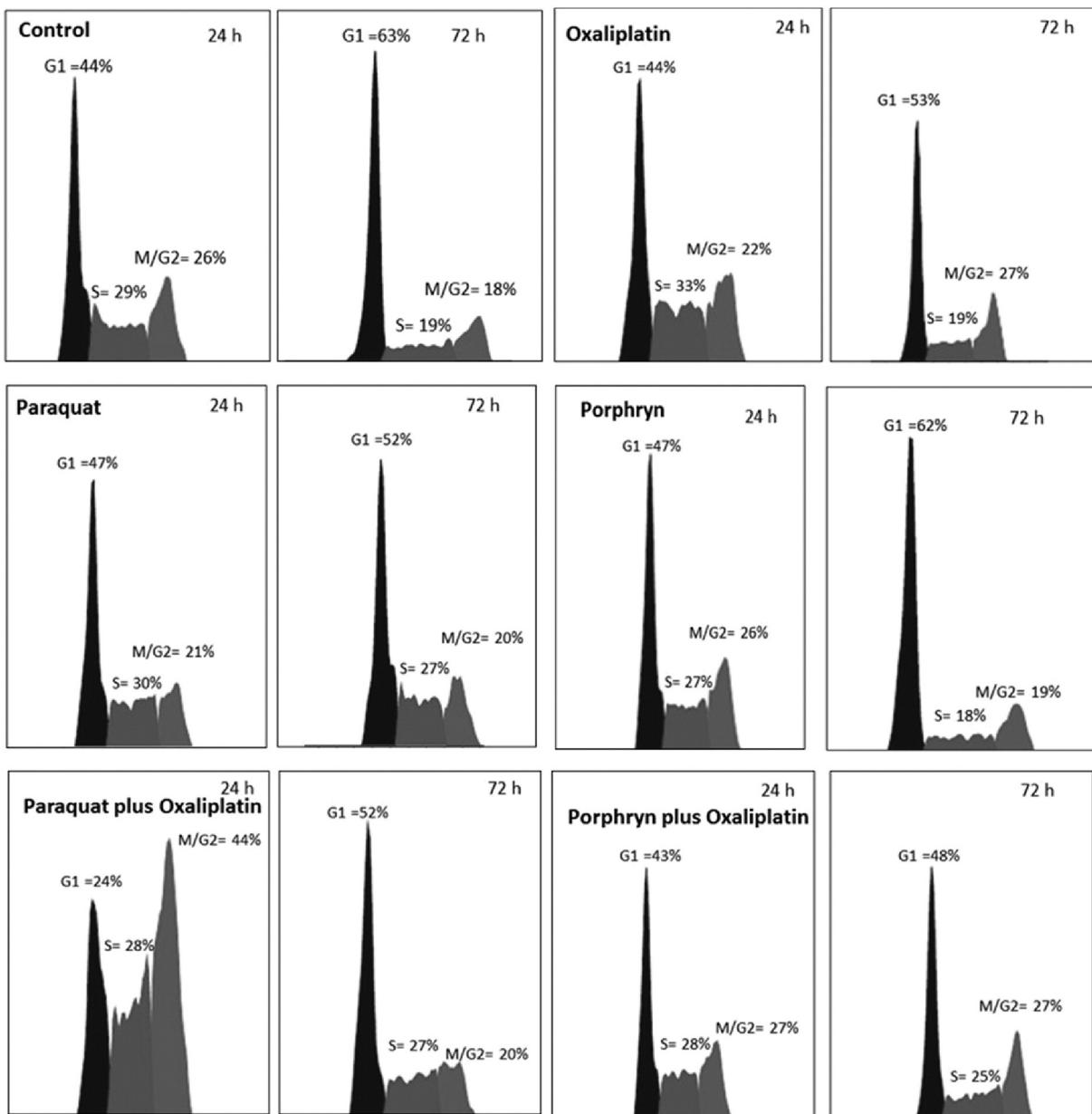


Fig. 3. Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell cycle determined by flow cytometry after 24 and 72 h exposition. Representative graphics with cell phases: (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis). Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

caspases 3 and 8. With the exception of Bcl-2 gene that was also up regulated by paraquat treatment, this treatment caused an inverse effect on p53 gene, which was down regulated, while caspases 3 and 8 genes were up regulated. Paraquat plus oxaliplatin treatment induced down-regulation of p53, BAX and caspase 8 gene. On the other hand, other genes did not change their expression pattern when compared to the control group. Porphyrin induced a higher up-regulation of all genes, except p53, which presented with expression similar to that of the control group. This pattern was not maintained when cells were concomitantly treated with porphyrin and oxaliplatin, as BAX gene was down regulated.

The effect on antioxidant gene modulation was also analyzed, and the findings revealed that, after 6 h, oxaliplatin treatment caused up-regulation of SOD2 gene, whereas the remaining antioxidant genes were not affected by this treatment. Paraquat induced a reverse response on the SOD2 gene, which was down regulated in the presence of this drug. However, unlike oxaliplatin treatment, paraquat slightly

up-regulated SOD1, CAT and GPX genes. Porphyrin caused higher up-regulation of the SOD1 gene and down-regulation of the SOD2 gene. CAT and GPX were also up regulated by this drug. Cells treated with a combination of paraquat and oxaliplatin also showed high up-regulation of the SOD1 gene and down-regulation of SOD2 and CAT genes. The GPX gene was slightly up regulated by this treatment. High SOD1 gene up-regulation was also observed in cells treated concomitantly with porphyrin and oxaliplatin. This treatment also slightly up-regulated SOD2 and GPX genes and down regulated the CAT gene.

4. Discussion

SOD2 is considered tumor suppressor gene in a large number of cancer cells. However, its effects on colorectal cancer appear to be reverse, since higher levels of SOD2 enzyme are found in tumors when compared to healthy tissues. As SOD2 is an antioxidant enzyme that participates in conjugate reactions in order to maintain superoxide anion

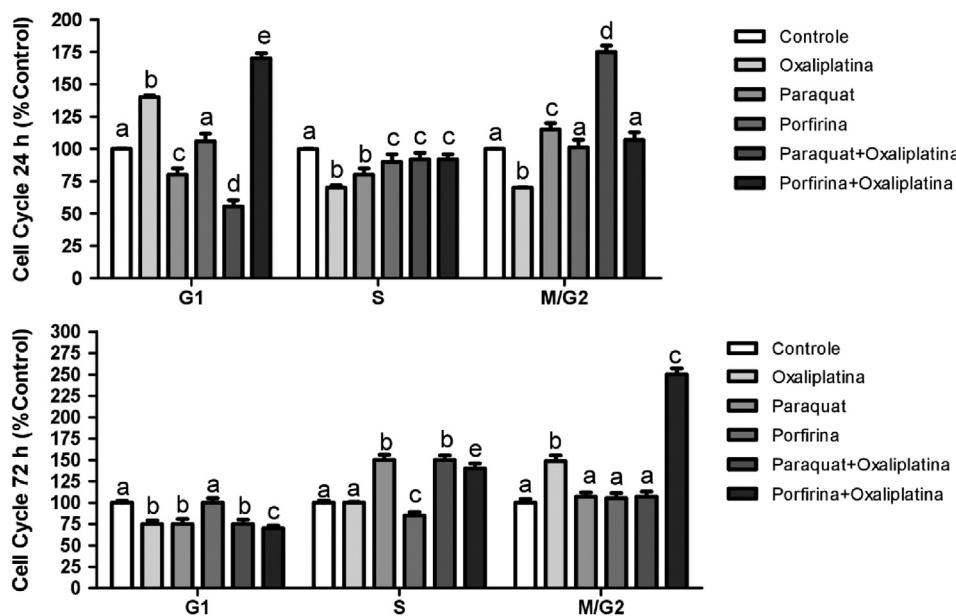


Fig. 4. Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on HT29 colorectal cancer cell cycle determined by flow cytometry after 24 and 72 h exposition. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different superscript letters indicate statistical difference among treatments ($p \leq 0.05$); Data are shown as % of untreated control group. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

levels at acceptable levels, the general role of superoxide-hydrogen peroxide imbalance in colorectal cancer cell biology needs to be clarified. For this reason, we designed an *in vitro* experiment to test the effect of high superoxide levels (by paraquat) or SOD2 levels (by porphyrin) on viability and proliferation of HT-29 colorectal cancer cells. In general, our results indicated that an increase in superoxide anion levels caused cytotoxic as well as apoptosis triggering.

We also observed an accentuated antiproliferative effect of paraquat, involving changes in cell cycle, especially interruption in the S phase. On the other hand, increased levels of SOD2-like molecules exhibited cytotoxic and antiproliferative effects, albeit less pronounced than those observed in cells exposed to high superoxide anion levels. These results suggest that, while HT-29 cells are sensitive to superoxide-hydrogen peroxide imbalance, this sensibility is highly accentuated when cells are exposed to high superoxide levels.

Available evidence indicates that cancer cells are generally under ROS stress. Thus, antioxidant enzymes such as SOD2 might play a critical role in carcinogenesis (Hu et al., 2005). However, with respect to colorectal cancer cells, it cannot be presently ascertained that SOD2 imbalance alone could be responsible for tumor progression. In fact, our results suggest that colorectal cancer cells have a specific oxidative metabolism status involving superoxide-hydrogen peroxide balance. Moreover, when this status is changed by increasing superoxide or hydrogen peroxide levels (by increasing SOD2 levels), cytotoxic and antiproliferative events occur. Therefore, we can speculate that, in colorectal cancer, control of superoxide anions could be critical, whereby increased SOD2 levels could be a metabolic strategy employed by cancer cells in order to maintain their homeostasis and proliferation rates. This premise is supported by previous studies, where the effect of an interference mRNA on SOD2 gene expression and colorectal cancer aggressiveness was investigated. In another study, the authors investigated the SNU-407 colorectal cell line, reporting that high hydrogen peroxide levels down-regulated tumor suppressor Runt-related transcription factor 3 (RUNX3) gene promoting the proliferation of these cells (Meng et al., 2013; Kang et al., 2013). An investigation using T-84 colorectal cancer cell line also showed that oxidative stress caused by hydrogen peroxide down-regulated a candidate tumor suppressor gene intestine-specific transcription factor, caudal type homeobox-1 (CDX1), thus increasing cancer cell proliferation. The CDX1 down-

regulation was abolished when cells were pretreated with N-acetylcysteine, which is a ROS scavenger molecule (Zhang et al., 2013). An epidemiological investigation recently performed by Naikaran and colleagues also highlighted the relevance of enzymatic antioxidant system in colorectal cancer biology. These authors analyzed gene and protein expression of antioxidant enzymes of 35 patients diagnosed with colorectal cancer and observed an important decrease in GPX levels in tumor tissue when compared to healthy tissues. In fact, in both situations, increased SOD2 levels and decreased GPX levels led to an increase of hydrogen peroxide concentrations in cells.

Our results also revealed that superoxide-hydrogen peroxide imbalance could modify the colorectal cancer cell sensitivity to oxaliplatin, a third-generation platinum compound that is currently used to treat colorectal cancer. The increase in superoxide levels caused by paraquat treatment improved the oxaliplatin cytotoxic effect, apoptosis induction, antiproliferative effect by increasing the frequency of the M/G2 phase cells after 24 h, while increasing that of the S phase cells after 72 h of treatment. In contrast, concomitant treatment with porphyrin and oxaliplatin decreased the cytotoxic effect of oxaliplatin (Fig. 1A) and reduced the number of apoptosis events (Fig. 1B). On the other hand, minimal concentration of porphyrin (0.1 μ M), when combined with oxaliplatin, caused an increase in cell proliferation rate when compared to cells treated with oxaliplatin only (Fig. 2).

Oxaliplatin is a compound that forms intra-strand links in the DNA molecule mainly between two adjacent guanine residues or a guanine and an adenine. These links are capable of disrupting DNA replication and transcription (Fink et al., 1997; Ceckova et al., 2008). This direct effect on DNA molecules explains the changes in the cell cycle of colorectal cancer cells, causing arrest in the G2/M cell cycle and transient S phase delay in the HT-29 cells (William-Faltaos et al., 2007). The cell cycle analysis showed that the increase in superoxide levels due paraquat treatment caused an important delay in the S phase and M/G2 phase after 24 h of exposure, as well as S phase arrest after 72 h of exposure in cells concomitantly treated with paraquat and oxaliplatin. On the other hand, the combination of porphyrin and oxaliplatin annulled the oxaliplatin effect on the cell cycle. These results suggest that cell oxidative status plays an important role in sensitivity to oxaliplatin.

This suggestion is according a previous investigation using peripheral blood mononuclear cells carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes

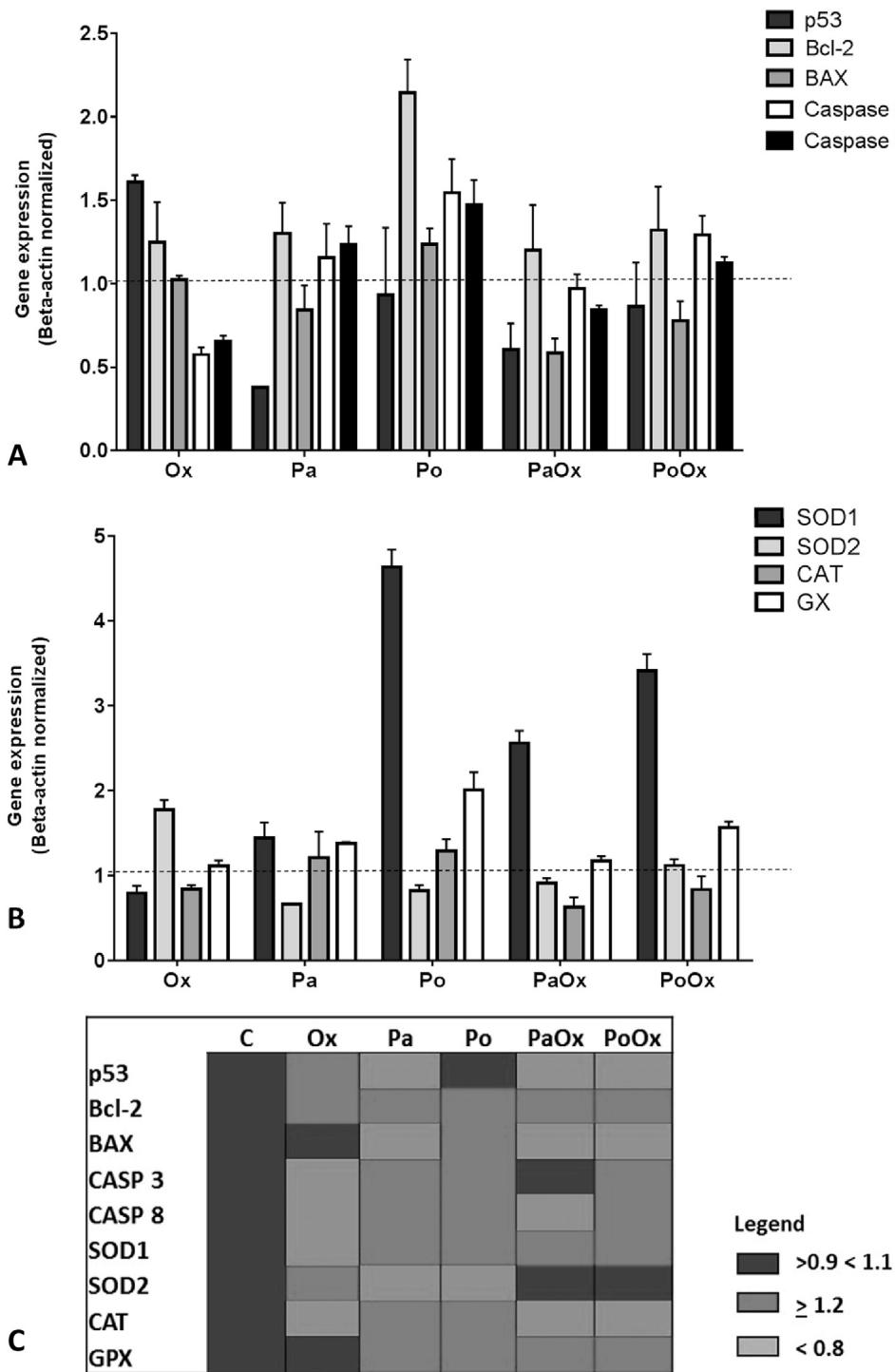


Fig. 5. Effect of paraquat (Pa), porphyrin (Po), oxaliplatin (Ox) and their combinations (PaOx, PoOx) on gene expression of HT29 colorectal cancer cell cycle. (A) Genes related to apoptosis pathway; (B) Antioxidant enzyme genes; (C) Representative scheme of gene modulation in the different treatments. Data were normalized by B-actin gene. Mean \pm sd are obtained from three independent repetitions.

that cause superoxide-hydrogen peroxide imbalance showed differential response when in vitro exposed to methotrexate (MTX) that use to some cancer treatments (Barbisan et al., 2014).

In the present investigation, we also evaluated the acute treatment effect on gene modulation related to cell proliferation, apoptosis and antioxidant enzymatic system. The results revealed highly heterogeneous response, with the exception of Bcl-2 gene, which was up-regulated by all treatments when compared to the untreated control group. In addition, only in the cells exposed to oxaliplatin up-regulation of p53 gene was noted. A functional p53 protein has been shown to be important

for the cellular response to several propapoptotic factors, including chemotherapeutic drugs used in the treatment of colorectal cancer (Bunz et al., 2008; Arango et al., 2001). The study performed by Arango and colleagues also showed that oxaliplatin is able to increase the p53 levels in colorectal cells. This effect is probably related to promotion of intrinsic apoptosis via cell cycle arrest caused by oxaliplatin. However, presence of elevated superoxide levels seems to revert the induction of p53 gene over-expression in cells treated with oxaliplatin, although paraquat plus oxaliplatin also caused an important increase in apoptosis levels and cell arrest. As paraquat and porphyrin caused acute up-

regulation of caspases 3 and 8, we cannot discard the possibility that the increase in superoxide levels activated the extrinsic apoptosis pathway. However, complementary investigations need to be performed to confirm this hypothesis.

Antioxidant genes of HT-29 colorectal cancer cells were also differentially modulated by oxaliplatin and other treatments. Paraquat and porphyrin treatments changed the antioxidant gene expression when compared to the control group, as up-regulation of SOD1, CAT and GPX genes and down-regulation of SOD2 gene was observed. These results indicated that colorectal cancer cells were very sensitive to oxidative status, presenting an acute gene response due to imbalances. The results yielded by gene expression analysis also suggest that oxaliplatin effect on antioxidant gene modulation is directly influenced by the cell oxidative status.

In conclusion, our findings suggest that superoxide-hydrogen peroxide imbalance is likely the main factor contributing to alterations in colorectal cancer cells, and that modulation of this balance can affect the sensitivity of these cells to chemotherapeutic response to oxaliplatin. As ROS has emerged as the key mediator of cellular oxidative stress, as well as redox dysregulation involved in cancer initiation and progression, this metabolism can be an important target for cancer treatment (Wondrak, 2009). Our results are in line with this perspective and can contribute to better understanding and potential use of drugs that modulate ROS levels, especially hydrogen peroxide during colorectal chemotherapy treatment.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

The authors thanks to CNPq (No 402325/2013-3; 490760/2013-9; 311446/2012-4), FAPERGS, FAPEAM and CAPES for grants and fellowships.

References

- Arango, D., Corner, G.A., Wadler, S., Catalano, P.J., Augenlicht, L.H., 2001. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 61, 4910–4915.
- Barbisan, F., Motta, J.R., Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Marcon, M., Algarve, T.D., Duarte, M.M., Mostardeiro, C.P., Unfer, T.C., Schott, K.L., da Cruz, I.B., 2014. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One* 9, e107299.
- Bica, C.G., de Moura da Silva, L.L., Toscani, N.V., da Cruz, I.B., Sá, G., Graudenz, M.S., et al., 2009. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 15, 19–24.
- Bica, C.G., da Silva, L.L., Toscani, N.V., Zettler, C.G., Gottlieb, M.G., Alexandre, C.O., et al., 2010. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 196, 153–158.
- Bresciani, G., da Cruz, I.B., González-Gallego, J., 2015. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv. Clin. Chem.* 68, 87–130.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2008. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497–1500.
- Bus, Gibson, J.E., 1984. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ. Health Perspect.* 55, 37–46.
- Ceckova, M., Vackova, Z., Radilova, H., Libra, A., Buncek, M., Staud, F., 2008. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. *Toxicol. in Vitro* 22, 1846–1852.
- Deferme, L., Briedé, J.J., Claessen, S.M.H., Cavill, R., Kleinjans, J.C.S., 2015. Cell line-specific oxidative stress in cellular toxicity: a toxicogenomics-based comparison between liver and colon cell models. *Toxicol. in Vitro* 29, 845–855.
- Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P.S., Aebi, S., Lin, T.P., Nehme, A., 1997. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 57, 1841–1845.
- Hu, Y., Rosen, D.G., Zhou, Y., 2005. Mitochondrial manganese superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280, 39485–39492.
- Janssen, A.M., Bosman, C.B., Kruidenier, L., Griffioen, G., Lamers, C.B., van Krieken, J.H., et al., 1999. Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 327–335.
- Kang, K.A., Kim, K.C., Bae, S.C., Hyun, J.W., 2013. Oxidative stress induces proliferation of colorectal cancer cells by inhibiting RUNX3 and activating the Akt signaling pathway. *Int. J. Oncol.* 43, 1511–1516.
- Kim, A., 2009. Modulation of MnSOD in cancer: epidemiological and experimental evidence. *Toxicol. Res.* 26, 83–93.
- Meng, X., Wu, J., Pan, C., Wang, H., Ying, X., Zhou, Y., et al., 2013. Genetic and epigenetic down-regulation of microRNA-212 promotes colorectal tumor metastasis via dysregulation of MnSOD. *Gastroenterology* 145, 426–436.
- Mohr, A., Büneker, C., Gough, R.P., Zwacka, R.M., 2008. MnSOD protects colorectal cancer cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibition of Smac/DIABLO release. *Oncogene* 27, 763–774.
- Montagner, G.F.F.S., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M.F., Cruz, I.B.M., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. in Vitro* 5, 1410–1416.
- Nozoe, T., Honda, M., Inutsuka, S., Yasuda, M., Korenaga, D., 2003. Significance of immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase as a marker of malignant potential in colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.* 10, 39–43.
- Oberley, L.W., 2005. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.* 59, 143–148.
- Oberley, L.W., et al., 1980. Cell differentiation, aging and cancer: the possible roles of superoxide and superoxide dismutases. *Med. Hypotheses* 6, 249–268.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- William-Faltaos, D., Rouillard, P., Lechat, G., 2006. Bastian. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 26, 2093–2099.
- William-Faltaos, S., Rouillard, D., Lechat, P., Bastian, G., 2007. Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 165–172.
- Wondrak, G.T., 2009. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 3013–3069.
- Zhang, Y., Gu, J., Zhao, L., He, L., Qián, W., Wang, J., et al., 2006. Complete elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy. *Cancer Res.* 66, 4291–4298.
- Zhang, R., Kang, K.A., Kim, K.C., Na, S.Y., Chang, W.Y., Kim, G.Y., Kim, H.S., Hyun, J.W., 2013. Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. *Gene* 525 (524), 214–219.
- Zhao, X., Huang, S., Luo, H., Wan, X., Gui, Y., Li, J., Wu, D., 2014. Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 1204–1213.