



Christie Berenice Alves da Graça Monteiro

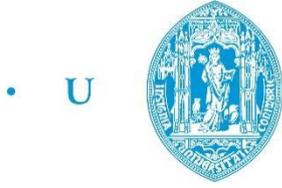
EGCG DO CHÁ VERDE — UM AGENTE NATURAL CONTRA O CANCRO DA MAMA

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, Especialização em Instrumentação Biomédica e Biomateriais, sob a supervisão da Doutora Ana Cristina Aguiar Santos e da Profª Doutora Bárbara Oliveiros, e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



C •

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Christie Berenice Alves da Graça Monteiro

EGCG* do chá verde – um agente natural contra o cancro da mama

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para
cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientadores:

Doutora Ana Cristina Aguiar Santos (IBB – iCBR - FMUC)

Prof^a Doutora Bárbara Oliveiros (LBIM – iCBR - CIBIT – FMUC)

Coimbra, 2018

*(-)-epigallocatequina-3-galato

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



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

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

Agradecimentos

Na vida aprendi que não importa apenas alcançar a meta, mas sim aprender o valor da caminhada, desfrutar da beleza dos pequenos momentos, saber que as soluções para os problemas não caem do céu, mas que de lá vem a força. O mais importante é que tudo é possível! O impossível é apenas uma questão tempo.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, meu Pai, Ele é a minha força, o meu alicerce. Por mais difícil que tenha sido a caminhada Ele sempre esteve ao meu lado, ajudando-me a ultrapassar os momentos difíceis. Obrigada Senhor!

Às minhas orientadoras Doutora Ana Cristina Santos e Prof^a Doutora Bárbara Oliveiros, gostaria de expressar a minha gratidão pelo enorme apoio, pela simpatia, paciência, entusiasmo e pela pronta disponibilidade sempre que precisei. Obrigada por tornarem a realização deste trabalho possível!

É de todo o coração que agradeço aos meus pais, Mateus e Hermínia, meus grandes mestres, que mesmo estando longe nunca deixaram faltar amor, carinho e o apoio incondicional nas horas de desespero. Os seus sábios conselhos fazem de mim a pessoa que sou hoje. Pai, Mãe não tenho palavras para agradecer tudo que têm feito por mim.

Aos meus irmãos Andreia, Lucas e David que, mesmo não estando presentes, todos os dias me proporcionaram grandes momentos de alegria, que conseguiam iluminar até os dias mais cinzentos.

Um agradecimento especial ao Márcio pela enorme paciência, o grande apoio e por muitas vezes ter enxugado as minhas lágrimas. Obrigada por tornar esta jornada mais fácil.

Agradeço também aos meus amigos por esses anos de companheirismo nas horas de alegria e tristeza.

Gostaria ainda de agradecer:

- ao Carlos pelo acompanhamento diário e ensinamentos que muito valeram para a realização deste trabalho;

- ao Filipe e à Mariana pela grande ajuda e companheirismo.

Ao Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelos recursos fornecidos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e, em particular, à Prof^a Doutora Teresa Batista pelo seu enorme interesse e disponibilidade constante.

À Prof^a Doutora Cristina Gonçalves do Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina, pela disponibilidade e apoio prestados na realização da citometria de fluxo.

À Prof^a Doutora Denise Priolli do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da Universidade São Francisco, Bragança – São Paulo, Brasil, pela grande ajuda com os estudos in vivo.

Ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) pela colaboração protocolada para a utilização de agentes quimioterapêuticos.

À equipa do iCBR pela partilha de conhecimentos e interajuda.

À equipa do Biotério pela colaboração nos estudos in vivo.

À Técnica de Laboratório Cláudia Brites pela indispensável ajuda na realização dos estudos histológicos.

À equipa do easyPET Fabiana Ribeiro, Dinis Sá, Nuno Ferreira, Ana Luísa Silva, Pedro Correia, Filipe Castro, Pedro Encarnação, Fabiana Rodrigues e João Veloso.

Um muito obrigado a todos!

Resumo

Há mais de uma década, muitos estudos concentraram-se no chá verde e seus benefícios para a saúde de longo prazo. São muitos os relatos dos seus múltiplos efeitos preventivos e terapêuticos. O chá é muito rico em polifenóis que têm efeito anti-inflamatório, antioxidante e propriedades antimutagênicas em vários sistemas biológicos. Dos vários polifenóis do chá verde, a (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o mais abundante das catequinas. O EGCG tem sido alvo de inúmeras pesquisas principalmente pelo seu efeito anticancerígeno. Estudos com animais, epidemiológicos e com casos humanos controlados revelaram um papel axial do chá verde e do EGCG na prevenção do cancro. Apesar de alguns estudos demonstrarem que algumas linhas celulares cancerígenas apresentam graus variáveis de sensibilidade ao EGCG, ele ainda é visto como uma nova substância química inibidora do cancro.

O objetivo deste projeto é verificar a citotoxicidade e a eficiência na inibição do crescimento celular induzida pelo EGCG proveniente de diferentes fontes (extratos e infusões) numa linha celular do cancro da mama, as MCF-7 - recolhendo dados que permitam compreender a interação entre o composto e as células. Avaliar o possível efeito adjuvante do EGCG para alguns agentes antineoplásicos usados na terapêutica do cancro da mama.

Deste modo o estudo experimental está dividido em duas partes: o estudo *in vitro* utilizando a linha celular do cancro da mama, as MCF-7 e, o estudo *in vivo* utilizando modelos animais imunodeficientes com inoculação subcutânea da linha celular MCF-7. Nos experimentos *in vitro* foi avaliada a ação do EGCG de diferentes fontes sobre as células MCF-7 e a ação dos agentes quimioterapêuticos administrados isoladamente comparativamente à sua ação associada ao EGCG sobre a linha celular MCF-7. Foram desenvolvidos modelos animais do cancro da mama para estudos imagiológicos.

Os resultados destes estudos descritos neste trabalho, demonstram a citotoxicidade do EGCG para estas células tumorais da mama e possivelmente auxiliar na terapêutica do cancro da mama.

Os estudos *in vitro* demonstraram que, em doses fisiológicas, o EGCG é seletivamente citotóxico para as células MCF-7 e que o tempo de incubação necessário para que esse efeito fosse mensurável foi de 7 dias, ou seja após 6 aplicações diárias dos extratos ricos em EGCG; o chá verde *Lipton*, quando utilizado como fonte de EGCG, mostrou ser citotóxico e inibiu

o crescimento das células MCF-7 nas mesmas condições. Além do efeito citotóxico, o EGCG, em doses fisiológicas, pode potencializar o efeito de agentes quimioterapêuticos utilizados na monoterapia do cancro da mama (CAP, PAX, DOT, 5-FU, EPI e DOX).

A realização de estudos imagiológicos utilizando a nova tecnologia do *easyPET* deu um forte suporte aos estudos *in vivo*, sendo bastante esclarecedor. O equipamento desenvolvido possui resolução e sensibilidade compatíveis com a detecção de tumor antes que este seja visível exteriormente, isto é, quando tem dimensões muito reduzidas (cerca de 1 mm²). Comprovou-se que esta tecnologia/equipamento permite efetuar o diagnóstico precoce do aparecimento de tumor em ratinhos Balb/C *nude*. Verificou-se ainda que a indução de tumor, por injeção subcutânea de células MCF-7 num modelo não-ortotópico, não alterou a morfologia normal dos tecidos dos animais e não se observaram metástases.

Palavras-chave: Chá verde, EGCG, cancro da mama, MCF-7

Abstract

For more than a decade, many studies have focused on green tea and its long-term health benefits. There are many reports of its multiple preventive and therapeutic effects. Tea is very rich in polyphenols that have anti-inflammatory, antioxidant and antimutagenic properties in various biological systems. Of the various green tea polyphenols, (-) - epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the most abundant catechins. EGCG has been the subject of numerous researches mainly due to its anticancer effect. Animal, epidemiological and controlled human cases studies have revealed an axial role of green tea and EGCG in cancer prevention. Although some studies have shown that some cancer cell lines have varying degrees of sensitivity to EGCG, it is still seen as a new cancer-inhibiting chemical.

The aim of this project is to verify the cytotoxicity and efficiency in inhibiting cell growth induced by different EGCG sources (extracts and infusions) in a breast cancer cell line, MCF-7 - collecting data to understand the interaction between compound and cells. To evaluate the possible adjuvant effect of EGCG for some antineoplastic agents used in breast cancer therapy.

Thus, the experimental study is divided into two parts: the *in vitro* study using the breast cancer cell line MCF-7 and the *in vivo* study using immunocompromised animal models with subcutaneous inoculation of the MCF-7 cell line. In the *in vitro* experiments the action of EGCG from different sources on MCF-7 cells and the action of the chemotherapeutic agents administered alone compared to their action associated with EGCG on the MCF-7 cell line was evaluated. Animal models of breast cancer have been developed for imaging studies.

The results of these studies described in this work demonstrate EGCG cytotoxicity for these breast tumor cells and possible assistance in breast cancer therapy.

In vitro studies have shown that, in physiological doses, EGCG is selectively cytotoxic for MCF-7 cells. It was also found that the incubation time required for this effect to be measurable, using EGCG from different extracts, is 7 days, i.e. after 6 daily EGCG applications; Lipton green tea, when used as a source of EGCG and performing a similar protocol, was shown to be cytotoxic and inhibited the growth of MCF-7 cells. In addition to the cytotoxic effect, EGCG, in physiologic doses, may potentiate the effect of

chemotherapeutic agents used in breast cancer monotherapy (CAP, PAX, DOT, 5-FU, EPI and DOX).

The use of *easy*PET technology strongly supported the *in vivo* studies, being quite enlightening. The developed equipment has both resolution and sensitivity compatible with the detection of tumor prior to external detection, that is, of very small dimensions ($\pm 1 \text{ mm}^2$). Thus, it allows an early diagnosis of the tumor development in Balb/C nude mice. Tumor induction, through subcutaneous injection of MCF-7 cells in a non-orthotopic model, did not alter the normal tissue/organ morphology of the animals and no metastases were observed.

Keywords: Green tea, EGCG, breast cancer, MCF-7

Acrónimos e Abreviaturas

5-FU – 5-fluorouracilo

ADP - *Adenosine diphosphate*

ATCC - American Type Culture Collection

Balb/C *nude* – ratinhos da estirpe Balb/C sem pêlo

BRCA1 – *Breast Cancer 1*

BRCA2 – *Breast Cancer 2*

CAP – Capecitabina

CDI – Carcinoma ductal invasivo

CDIS – Carcinoma ductal *in situ*

CLI – Carcinoma lobular invasivo

CLIS – Carcinoma lobular *in situ*

COMT - *Catecol-O-metiltransferase*

CSCs – *Cancer Stem Cells*

DMBA - 7,12 dimetilo-benzantraceno

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

DMSO – *Dimetilsulfóxido*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DOT – Docetaxel

DOX – Doxorrubicina

EGCG – (-)-epigalocatequina-3-galato

EMEM – *Eagle's Minimum Essential Medium*

EPI – Epirubicina

¹⁸F – *Fluor-18*

FBS – *Soro fetal bovino*

FDG – *Fluorodesoxiglicose*

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

GTE - *Green Tea Extract*

GTE em pó – *Green Tea Extract powder*

GTEE – *Green Tea EGCG Extreme™*

HER2 – Recetores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HPLC - *High-performance liquid chromatography*

IGFBP-2 - *Insulin-like growth factor binding protein-2*

IGF-IR - *Insulin-like growth factor-I receptor*

M – Metástases

MCF-7 - *Michigan Cancer Foundation-7*

MGTE – *Mega Green Tea Extract*TM
MMP-2 – Metaloproteinase de matriz-2
MOCF – Microscópio ótico de contraste de fase invertido
MTT - {Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}
mTOR - *mammalian target of rapamycin*
N – Linfonodos
N1mi - micrometástases
PARP - *poly (ADP-ribose) polymerase*
PAX – Paclitaxel
PET – Positron Emission Tomography
RE – Recetores de estrogénio
RMN - Ressonância magnética nuclear
RNU – Rowett nude rat
ROS - *Reactive Oxygen Species*
RP – Recetores de progesterona
SCID - Severe combined immunodeficiency
STAT3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SULT – Sulfotransferase
T – Tumor
TAC - Tomografia computadorizada
Tis – Tumor *in situ* (ductal ou lobular)
TTN – Tumores triplo negativos
UGT - UDP-glucuroniltransferase
VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

Índice de Figuras

Figura 1 – Imagem que ilustra as componentes anatómicas da mama (adaptada da American Cancer Society [20]).	9
Figura 2 – Imagem ilustrativa da transformação de ductos e lóbulos normais em cancerígenos pelo crescimento anormal das células que revestem a sua parede interna (adaptada da American Cancer Society [20]).	11
Figura 3 – Esquema ilustrativo as duas teorias hipotéticas sobre a iniciação e progressão do cancro da mama. [A] Todos os subtipos do cancro da mama são derivados das mesmas células-tronco ou células progenitoras e os diferentes fenótipos dos tumores devem-se a eventos de transformação específicos do subtipo. [B] Cada subtipo do cancro da mama tem início a partir de um único tipo de célula (célula-tronco, célula progenitora ou célula diferenciada). Mutações aleatórias podem acumular-se gradualmente em qualquer célula da mama, levando à sua transformação em células tumorais quando acumula um determinado número de mutações (adaptado de [8], [56]).	16
Figura 4 – Estrutura química da epigalocatequina-3-galato (adaptado de [85]).	27
Figura 5 - Câmara de Neubauer (adaptado do [113]).	38
Figura 6 – Esquema resumido do protocolo seguido para a realização das experiências in vitro.	43
Figura 7 – Esquema ilustrativo do teste de viabilidade celular com MTT, em que a atividade glicolítica das células, após serem incubadas com os compostos em estudo, é avaliada através da ação das desidrogenases mitocondriais. Estas transformam o MTT, de coloração amarela, em cristais de coloração roxa. A produção desses cristais reflete o estado funcional da cadeia respiratória e, conseqüentemente, a viabilidade celular.	44
Figura 8 – Esquema que resumido do procedimento de injeção de células do cancro da mama em ratos e ratinhos fêmea.	49
Figura 9 – Gráfico relativo à análise da viabilidade celular da linha MCF-7, para os valores de MTT padronizados por % do valor do controlo, após aplicação diária de GTEE, MGTE ou GTE pó com diferentes concentrações de EGCG (0,5; 1; 5 e 10 µg/ml) com 2, 3, 4, 6 e 8 aplicações, ou seja, respetivamente, 3, 4, 5, 7 e 9 dias.	57
Figura 10 – Gráfico relativo à análise de viabilidade celular das células MCF-7 após administração diária de EGCG seguindo dois modelos de aplicação: crónica (mantém-se o meio de cultura e adiciona-se a dose de EGCG diariamente) e aguda (renovação diária do meio de cultura e da dose de EGCG).	60
Figura 11 – Gráfico relativo à comparação da viabilidade celular das MCF-7 nos modelos crónico e agudo, sendo realizadas as comparações dos dois modelos ao fim de 2, 4 e 6 aplicações, ou seja, respetivamente, 3, 5 e 7 dias.	61
Figura 12 – Gráfico relativo à comparação da viabilidade das células MCF-7 após aplicação do modelo crónico e agudo para cada um dos extratos.	62
Figura 13 – Gráfico relativo à análise da viabilidade celular das MCF-7, comparando a eficácia das diferentes concentrações de EGCG para cada um dos extratos (GTEE, MGTE e GTE pó) ao fim de 2, 3, 4, 6 e 8 aplicações diárias.	64
Figura 14 – Gráfico relativo à comparação do efeito das diferentes concentrações de EGCG presentes no GTEE sobre a viabilidade celular das células MCF-7 com aplicações diárias do mesmo.	65

Figura 15 – Gráfico relativo à comparação da eficácia das diferentes concentrações de EGCG presentes no MGTE sobre a viabilidade celular das células MCF-7 com aplicações diárias do mesmo.	66
Figura 16 – Gráfico relativo à comparação da eficácia das diferentes concentrações de EGCG presentes no GTE pó sobre a viabilidade celular das células MCF-7 com aplicações diárias do mesmo.	67
Figura 17 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular da linha celular MCF-7 (valores de MTT padronizados à % do valor médio dos controlos) após aplicação diária de infusões de chá verde Lipton preparados com 1, 2 e 3 saquetas, com concentrações de 0,5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	68
Figura 18 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular da linha celular MCF-7 (valores de MTT padronizados à % do valor médio dos controlos) após aplicação diária de infusões de chá verde Lipton preparados com 2 e 3 saquetas, com concentrações de 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	69
Figura 19 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 (valores de MTT padronizados a % do valor médio dos controlos) após aplicação diária de infusões de chá verde Lipton preparado com 2 e com 3 saquetas, comparando as concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	70
Figura 20 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação diária de infusões de chá verde Lipton preparados com 1, 2 e 3 saquetas, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	71
Figura 21 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua ação isolada e em associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 0,5 µg/ml de EGCG num total de 6 (7 dias).	72
Figura 22 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua ação isolada e em associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	73
Figura 23 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Usando o teste de Mann-Whitney, obteve-se $p = 0,817$	73
Figura 24 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua ação isolada e em associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	74
Figura 25 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando a sua ação isolada e em associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	75
Figura 26 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando a sua ação isolada e a sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).	76
Figura 27 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Usou-se o teste de Mann-Whitney, obteve-se $p = 0,470$	77
Figura 28 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando a sua ação isolada e a associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 dias.	77
Figura 29 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua ação isolada e a associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações).	78

Figura 30 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua ação isolada e em associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Usando o teste de Kruskal-Wallis comparou-se a eficácia isolada do fármaco e do GTE, e a eficácia da associação dos dois, $p = 0,319$.	79
Figura 31 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Usando o teste de Mann-Whitney obteve-se $p = 0,001$.	79
Figura 32 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua ação isolada e a associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações.	80
Figura 33 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações)	81
Figura 34 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações).	82
Figura 35 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações. Usando o teste de Mann-Whitney, obteve-se um $p = 0,954$.	83
Figura 36 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações).	83
Figura 37 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações.	85
Figura 38 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações. Usando o teste de Kruskal-Wallis foi comparada a eficácia isolada do fármaco e do GTE, além da eficácia da associação dos dois, $p = 0,123$.	86
Figura 39 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOX, avaliando sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações. Usando o teste de Mann-Whitney, obteve-se $p = 0,273$.	86
Figura 40 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações.	87
Figura 41 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações.	88
Figura 42 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao GTEE aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações	89
Figura 43 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao EGCG-sigma aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações	90

Figura 44 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e em associação com chá Lipton (1, 2 e 3 saquetas) aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações.	91
Figura 45 – Estrutura química de Doxorubicina e Epirrubicina, mostra claramente que são isômeros.	92
Figura 46 – Gráficos relativos à comparação da viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações, usando o teste de Kruskal-Wallis. [A] viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX ao fim de 7 dias; [B] viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX seguida de GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações (7 dias); [C] viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX seguida de GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações (7 dias).	93
Figura 47 – Experiência de citometria de fluxo que mostra os diferentes tipos de morte celular para a amostra controlo, CAP aplicada sozinha e sua associação o GTE pó, chá Lipton 2 e 3 saquetas e GTEE, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml.	95
Figura 48 – Experiência de citometria de fluxo que mostra os diferentes tipos de morte celular para a amostra controlo, a PAX aplicada sozinha e sua associação o GTE pó, chá Lipton 2 e 3 saquetas e GTEE, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml.	96
Figura 49 – Experiência de citometria de fluxo que mostra os diferentes tipos de morte celular para a amostra controlo, a DOT aplicado sozinha e sua associação o GTE pó, chá Lipton 2 e 3 saquetas, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml.	97
Figura 50 – Ratinho fêmea Balb/C nude (identificação: 1d) com $2,8 \times 10^6$ células da linha celular MCF-7 injetadas subcutaneamente a 30/11/17 + injeção de β-estradiol (0,5 a 0,75 mg/ml) uma semana depois, a 7/12/17. Sem tumor visível a olho nu (peso do animal: 20,4 g), no dia 28/03/18 foi efetuado a aquisição de imagem. 1º ¹⁸ F-FDG injeção intraperitoneal do lado esquerdo, com atividade registada de 680 µCi; 2º Após 30 minutos injeção intraperitoneal do anestésico no lado direito; 3º 20 minutos depois inicia-se a aquisição por um período de 50 minutos. Na figura observam-se os cortes transversal, coronal e sagital da aquisição feita.	100
Figura 51 – Ratinho fêmea Balb/C nude (identificação: s/f) com $2,8 \times 10^6$ células da linha celular MCF-7 injetadas subcutaneamente a 30/11/17 + injeção de β-estradiol (0,5 a 0,75 mg/ml) uma semana depois, a 7/12/17. Sem tumor visível a olho nu (peso do animal: 23,2 g), no dia 28/03/18 foi efetuada a aquisição de imagem. 1º ¹⁸ F-FDG injeção intraperitoneal do lado esquerdo, com atividade registada de 470 µCi; 2º Após 30 minutos injeção intraperitoneal do anestésico no lado direito; 3º 20 minutos depois inicia-se a aquisição por um período de 50 minutos. Na figura observam-se os cortes transversal, coronal e sagital da aquisição feita.	101
Figura 52 - Exemplo de corte histológico de glândula mamária de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×). É possível identificar ácinos, vasos sanguíneos, estroma intralobular e interlobular. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.	103
Figura 53 - Exemplo de corte histológico de útero de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar o endométrio, o miométrio e as glândulas uterinas. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.	103
Figura 54 - Exemplo de corte histológico de ovário de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 100×): é possível identificar folículos primários e vasos sanguíneos. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.	104

Figura 55 - Exemplo de corte histológico de pulmão de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar canal alveolar, saco alveolar, alvéolos e vasos sanguíneos. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.	104
Figura 56 - Exemplo de corte histológico de fígado de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 100×): é possível identificar hepatócitos e veias. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.	105
Figura 57 - Exemplo de corte histológico de rim de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar o córtex renal, a medula renal, os glomérulos de Malpighi e vasos sanguíneos. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.	105
Figura 58 - Exemplos de cortes histológicos de tumor MCF7 de ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar a cápsula fibroelástica, a porção secretora e o canal da porção secretora. Verifica-se que o tumor é constituído por uma extensa porção secretora, perdendo praticamente todo o tecido conjuntivo interlobular.	106

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Carcinomas da mama mais comuns (adaptada de [25]–[30])	11
Tabela 2 - Subtipos moleculares do cancro da mama (adaptado de [35]–[37]).....	12
Tabela 3 – Descrição dos subtipos moleculares do cancro da mama (adaptada de [32], [34][41]– [49])......	13
Tabela 4 – Grau histológico de diferenciação do cancro da mama (adaptado de [50], [51])......	14
Tabela 5 – Classificação TNM do cancro da mama (adaptada de [28], [32])......	14
Tabela 6 - Classificação do cancro da mama em estádios (adaptada de [52]–[55]).	15
Tabela 7 - Tratamento do cancro da mama de acordo com o estadiamento da doença (adaptado de [59], [60]).	19
Tabela 8 – Fármacos utilizados em quimioterapia do cancro da mama (adaptada de [65]).	20
Tabela 9 - Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG presente nos extratos de chá verde em cápsula e em pó.	55
Tabela 10 - Avaliação quantitativa de EGCG recuperado durante a preparação de uma, duas e três saquetas de chá verde da marca Lipton.	56
Tabela 11 – Análise de sobrevivência (tempo necessário para se atingem 70% do valor médio dos controlos da própria experiência) para a linha MCF-7, após aplicação de GTEE, MGTE e GTE pó com diferentes concentrações de EGCG.	59
Tabela 12 – Análise comparativa da viabilidade celular das MCF-7 usando o teste de Mann-Whitney para os dois modelos de aplicação das doses de EGCG, em função do número de aplicações (tempo).....	61
Tabela 13 – Valores de p obtidos para a comparação dos valores de MTT entre as diferentes concentrações, para cada uma das substâncias administradas, ao final de 2, 3, 4 e 6 aplicações diárias.....	64
Tabela 14 – Resultados referentes à análise estatística do 5-FU e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.	72
Tabela 15 – Resultados referentes à análise estatística do 5-FU e do GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG.	73
Tabela 16 – Resultados referentes à análise estatística da CAP e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.	75
Tabela 17 – Resultados referentes à análise estatística da CAP e do GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG	76
Tabela 18 – Resultados referentes à análise estatística de DOT e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.	79
Tabela 19 – Resultados referentes à análise estatística de PAX e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.	81
Tabela 20 – Resultados referentes à análise estatística de PAX e do GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG.	82
Tabela 21 – Resultados referentes à análise estatística da DOT e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.	85

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Acrónimos e Abreviaturas.....	xiii
Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xxi
Índice	xxiii
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 OBJETIVOS	1
1.2 MOTIVAÇÃO.....	2
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	4
Capítulo 2	7
Revisão da literatura	7
2.1 CANCRO – INTRODUÇÃO GERAL	7
2.2 CANCRO DA MAMA	7
2.2.1 A mama.....	8
2.2.2 Classificação do cancro da mama.....	10
2.2.3 Patogénese do cancro da mama	15
2.2.4 Fatores de risco	16
2.2.5 Epidemiologia.....	17
2.2.6 Terapêutica do cancro da mama	18
2.2.7 Modelo <i>in vitro</i> - linha celular MCF-7.....	21
2.3 METABOLITOS NATURAIS – NOVAS ABORDAGENS NA LUTA CONTRA O CANCRO	23
2.3.1 <i>Chá verde</i>	24
2.3.2 EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato	26
Capítulo 3	33
Materiais e métodos.....	33
3.1 LINHA CELULAR SELECIONADA	33
3.2 CULTURA DAS CÉLULAS MCF-7	33
3.3 CHÁ VERDE E EXTRATOS DE CHÁ VERDE UTILIZADOS	39
3.4 ANÁLISE HPLC.....	40
3.5 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	41
3.6 ENSAIO DE MTT – TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	43
3.7 CITOMETRIA DE FLUXO – MEDIÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS CELULARES	45
3.8 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	46
3.9 ESTUDOS IMAGIOLÓGICOS – TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES (PET).....	49
3.10 ESTUDOS HISTOLÓGICOS	51
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
Capítulo 4	55
Resultados e discussão	55
□ ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	56
4.1 PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DE MTT	56

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO ÓTIMO PARA AVALIAÇÃO.....	56
4.2.1 Avaliação da influência do tempo em cultura nos valores de MTT (% controlo)	56
4.2.2 Determinação do tempo necessário para que seja mensurável a eficácia relativa dos extratos ...	58
4.3 MODELO DE APLICAÇÃO DOS COMPOSTOS (APLICAÇÃO CRÓNICA <i>VERSUS</i> APLICAÇÃO AGUDA)	59
4.4 SELEÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO PARA CADA EXTRATO	63
4.5 INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE SAQUETAS DO CHÁ <i>LIPTON</i> AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DO MTT.....	67
4.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ISOLADA E ASSOCIADA AO EGCG PARA CADA UM DOS FÁRMACOS UTILIZADOS. 71	
4.6.1 5-fluorouracilo (5-FU)	71
4.6.2 Capecitabina (CAP).....	75
4.6.3 Docetaxel (DOT)	78
4.6.4 Paclitaxel (PAX)	80
4.6.5 Doxorubicina (DOX).....	84
4.6.6 Epirubicina (EPI).....	87
4.6.7 Epirubicina & Doxorubicina (EPI & DOX).....	91
4.7 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR – CITOMETRIA DE FLUXO.....	94
□ ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	98
4.8 IMAGENS DE PEQUENOS ANIMAIS (RATINHOS) COM SISTEMA <i>EASYPET</i>	98
4.9 ESTUDOS HISTOLÓGICOS	101
Capítulo 5	107
Conclusões e perspetivas futuras.....	107
Referências bibliográficas	113
ANEXOS.....	121
ANEXO I.....	123
ANEXO II	124

Capítulo 1

Introdução

1.1 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo obter dados que ajudem a esclarecer o papel da (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) como um agente natural na luta contra o cancro, quer isoladamente, quer associado a agentes quimioterapêuticos. O estudo foi realizado utilizando uma linha celular de cancro da mama: MCF-7 (ATCC® HTB – 22TM, Rockville, Md., EUA).

Para tentar alcançar este objetivo foram definidos objetivos secundários:

1. em primeiro lugar foi necessário determinar após quanto tempo de incubação, com aplicações diárias de EGCG de diferentes fontes, se verificou uma redução de 30% na viabilidade celular;
2. avaliar o melhor tipo de aplicação de EGCG de várias fontes: crónica ou aguda;
3. escolher a melhor concentração de EGCG de várias fontes a ser aplicado nesta linha celular;
4. avaliar a eficácia de chá verde Lipton comercial, como fonte de EGCG, nesta linha celular;
5. avaliar a citotoxicidade, per si e em associação, de EGCG (de diferentes fontes) e fármacos utilizados em monoquimioterapias no cancro da mama;
6. avaliar o tipo de morte celular das células MCF-7 após terapêutica com: aplicação isolada de EGCG (de diferentes fontes), destes fármacos e ação conjunta de fármacos e destas fontes de EGCG.

Neste contexto, pretendeu avaliar-se a possível citotoxicidade e eficácia do EGCG na inibição do crescimento da linha celular MCF-7, utilizando diferentes concentrações de EGCG, presentes nos extratos de chá verde e infusões de chá verde selecionados.

Realizaram-se estudos *in vitro* com a linha celular MCF-7 incubada com EGCG, com alguns fármacos instituídos para o tratamento do cancro da mama e com associação de EGCG com estes fármacos, com vista a uma possível combinação de EGCG como adjuvante

terapêutico, amplificando/potenciando os efeitos anticancerígenos de fármacos usados em quimioterapia.

Paralelamente, realizaram-se estudos *in vivo* em modelos animais de xenoenxertos em estirpes imunocomprometidos (ratinhos Balb/C *nude* e ratos RNU), induzidos pela linha celular MCF-7. Como terapêutica usaram-se extratos de chá verde ricos em EGCG e infusões concentradas de chá verde.

1.2 Motivação

Há muito que o cancro tem sido uma preocupação global crescente para a saúde. Por ano mais de 5 milhões de pessoas são diagnosticadas com cancro e mais de 3,5 milhões de pessoas morrem devido a esta patologia [1]. Vários métodos modernos de tratamento, tais como terapias direcionadas, têm as suas limitações, inclusive o desenvolvimento de resistência a fármacos antineoplásicos (usados na quimioterapia) por parte das células cancerígenas e até a recorrência do tumor após tratamento. Por outro lado, alguns cancros não podem ser completamente removidos por cirurgia ou por radiação, que pode mesmo não ser possível dependendo de vários fatores, além de que, estes tratamentos podem destruir também os tecidos normais adjacentes ao tumor. Do mesmo modo, os fármacos utilizados no tratamento do cancro destroem tecidos de crescimento rápido, tais como a medula óssea e a mucosa do tubo digestivo. Neste contexto, existe a necessidade de desenvolver novas metodologias terapêuticas que visam reduzir/eliminar estes efeitos indesejados mantendo a eficácia do tratamento [2].

Curiosamente, muitos estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram os efeitos protetores de fatores dietéticos sobre os diversos tipos de cancro em humanos. Os compostos polifenólicos naturais derivados de plantas são um tesouro inestimável da natureza, que pode ser utilizado para bloquear vários estágios da carcinogénese, o que reforça a quimioprevenção como uma abordagem valiosa, para deter ou retardar este processo antes que se desenvolva a malignidade [2].

Para muitos tipos de cancro, as análises de incidência a nível racial demonstraram que nas populações asiáticas a incidência e a mortalidade por cancro são reduzidas, o que parece estar relacionado com a ingestão dietética de chá verde. Assim, tem sido crescente o interesse em estudar o chá verde como agente quimiopreventivo e quimioterapêutico. Mais

especificamente a biodisponibilidade e a biotransformação dos seus polifenóis são os responsáveis por mecanismos de controlo do crescimento e morte celulares e também da angiogénese - sendo conhecidos como potentes agentes antioxidantes [1,3].

O composto derivado do chá verde, mais abundante e popular, em estudo é a (-) – epigallocatequina – 3 – galato (EGCG), indicado como um agente preventivo do cancro, por atuar como poderoso antioxidante e por inibir várias proteínas relacionadas com a proliferação e sobrevivência das células tumorais [4]. Vários estudos têm demonstrado o efeito anticancerígeno do EGCG em várias linhas celulares de cancro: próstata, mama, laringe, rins, pulmão, pâncreas, estômago e cólon [2]. Desse modo, o EGCG é um potencial aliado no combate do cancro, podendo contribuir para uma melhor eficácia e potenciação terapêutica e, simultaneamente, levar a uma diminuição dos efeitos secundários associados aos tratamentos. Em última instância, a administração de EGCG/chá verde poderá permitir uma diminuição das doses dos fármacos, usados na quimioterapia, administrados ao doente.

O cancro da mama é o segundo tipo de cancro mais comum entre as mulheres de todo o mundo, a seguir ao melanoma - o tipo mais agressivo de cancro de pele. A incidência do cancro da mama nos homens é aproximadamente 1%. Em Portugal, são diagnosticados todos os anos aproximadamente 6 000 novos casos de cancro da mama e cerca de 1 500 mulheres morrem devido a esta patologia [5].

A causa de morte mais comum são as metástases, que disseminam a patologia até órgãos vitais como o fígado, o pulmão, a coluna vertebral e o cérebro. Como a mama é um órgão muito vascularizado, as células malignas podem seguir pelos vasos sanguíneos ou pelos vasos linfáticos para outras partes do corpo. Assim a deteção precoce da doença diminui as hipóteses de se formarem metástases [5].

O cancro da mama é uma das patologias com maior impacto na sociedade, uma vez que é um dos tumores malignos mais comum e com uma elevada taxa de mortalidade. É uma doença temida, já que afeta a perceção da sexualidade e a imagem pessoal da mulher. Os tratamentos, muitas vezes prolongados no tempo, podem associar-se a efeitos que podem interferir negativamente na vida da mulher, bem como na vida familiar, profissional e social. Principalmente se forem mulheres jovens há outras facetas a acrescentar a esta problemática, especialmente a nível da maternidade, já que a quimioterapia tem efeitos sobre a fertilidade, desenvolvimento do feto e amamentação [5].

A ciência tem feito inúmeros progressos na busca de novas terapêuticas capazes de “curar” e minorar a doença e a cada dia surgem novos dados, que são mais um passo na luta contra o cancro.

Numerosos agentes fitoquímicos dietéticos mostraram atividades anticancerígenas quando testados *in vitro* em linhas celulares de cancro da mama; no entanto, na maioria dos casos, a eficácia demonstrada para estes agentes fitoquímicos individuais requer doses não prontamente alcançáveis *in vivo*. Assim, os benefícios que as dietas podem exercer em contexto clínico e de prevenção do cancro da mama ainda não estão clarificados. Há inúmeros fatores envolvidos que é necessário esclarecer. É interessante avaliar se uma abordagem “multicomposto”, envolvendo baixas doses fisiologicamente viáveis de agentes dietéticos, pode ser desenvolvida como uma estratégia quimiopreventiva ou mesmo adjuvante em terapêutica para o cancro da mama [6].

Neste trabalho foi investigado o efeito da combinação do EGCG, em doses subótimas, e de fármacos antineoplásicos, instituídos para tratamento do cancro da mama, num sinergismo de supressão da proliferação celular e citotoxicidade do tratamento, em comparação com os diferentes agentes utilizados isoladamente.

1.3 Estrutura da dissertação

A presente dissertação é constituída por seis capítulos.

No **Capítulo 1** são apresentados os objetivos deste trabalho e os motivos que incentivaram a sua realização.

O **Capítulo 2** compreende a revisão da literatura, abordando inicialmente os aspetos referentes ao cancro da mama. É feita a descrição anatómica do órgão para que se possa ter uma melhor perspetiva de como se desenvolve o cancro da mama e quais os parâmetros alterados nesse processo. É feita igualmente uma breve descrição da linha celular do cancro da mama utilizada: MCF-7. São descritos também os avanços na pesquisa do chá verde desde a sua origem e cultivo, composição e interação com os sistemas fisiológicos. Inclui-se, ainda, uma revisão sobre a epigallocatequina-3-galato (EGCG), com foco nos seus efeitos anticancerígenos, centrando para o cancro da mama e a sua possível utilização como um adjuvante/potenciador no tratamento deste tipo de cancro.

No **Capítulo 3** são apresentados os métodos e os procedimentos experimentais utilizados na realização deste projeto, desde a cultura e manutenção das células, preparação do chá e dos extratos, a ensaios realizados *in vitro* e procedimentos *in vivo*, que tornaram possível efetuar uma análise estatística e discussão a partir de técnicas como: teste de viabilidade celular MTT, análise HPLC, citometria de fluxo e análise imagiológica PET.

No **Capítulo 4** são apresentados e discutidos os resultados obtidos, com base nas técnicas referidas no Capítulo 3.

No **Capítulo 5** são apresentadas conclusões retiradas dos resultados apresentados no capítulo anterior, bem como limitações deste trabalho e indicações para melhoramento, e ainda perspectivas de trabalho futuro.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2.1 Cancro – introdução geral

Uma neoplasia (ou tumor) corresponde a uma lesão devida a proliferação celular descontrolada. Esta proliferação conduz a uma acumulação progressiva de células alteradas, que formam um nódulo ou massa tumoral, visível ou palpável quando superficial, ou detectável apenas através métodos imagiológicos (por exemplo: ecografia, TAC (Tomografia Axial Computadorizada), RMN (Ressonância Magnética Nuclear), etc.) [7]. Embora as neoplasias sejam normalmente bastante heterogêneas, podem ser divididas, em termos de classificação, em dois grandes grupos: as neoplasias benignas e as neoplasias malignas, também designadas por cancro. As neoplasias malignas são potencialmente fatais, uma vez que conseguem invadir e destruir o local de origem e as zonas adjacentes, podendo ainda disseminar-se à distância. Esta disseminação ou metastização ocorre através da corrente sanguínea e/ou linfática, podendo desenvolver-se em vários locais, por exemplo: gânglios linfáticos, pulmões, mama, intestinos, fígado, pâncreas, ossos, cérebro. Existem, portanto, muitos tipos de cancro, dependendo da célula e tecido de origem, com comportamento clínico e tratamento bastante diferentes [7].

2.2 Cancro da mama

O desenvolvimento do cancro da mama é causado pela acumulação gradual e vitalícia de mutações adquiridas, somáticas e mudanças epigenéticas que afetam as células do tecido mamário e as suas progenitoras [8]. Análises recentes do genoma de vários tumores demonstraram que a complexidade molecular e a heterogeneidade clínica do cancro da mama podem ser devidas às chamadas mutações *driver*, em português, mutações condutoras. Mutações *driver* correspondem a uma ampla variedade de mutações que conduzem ao processo tumorigénico, isto é, afetam frequentemente genes que codificam proteínas responsáveis pela homeostase do tecido normal. Os mecanismos que conduzem células

normais a transformar-se em células neoplásicas incluem descontrolo do ciclo de divisão celular, fuga de células com maturação deficiente e senescência revogada à apoptose [9–11].

O processo de carcinogénese divide-se normalmente, para facilidade de estudo, em 3 fases: iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação do cancro tem origem nas modificações genéticas, alterações irreversíveis resultantes de pequenas mutações, transversões, transições e/ou deleções no DNA celular [12]. Nesta fase também podem ocorrer modificações nas histonas, na transcrição ou mesmo na metilação do DNA sem afetar a sequência do próprio DNA [13]. O segundo estágio, denominado promoção, implica alterações reversíveis na expressão do genoma por intermédio da interação promotor-recetor. O estágio final corresponde à progressão que se caracteriza por instabilidade cariotípica, ou seja, instabilidade cromossómica e crescimento maligno, favorecido pela acumulação de erros genéticos devido ao aumento da proliferação celular [12,14].

O mecanismo molecular na base das alterações hereditárias que estimulam o desenvolvimento do cancro da mama não é ainda claro. Porém, é de salientar que a maior parte dos genes de suscetibilidade para o cancro codificam proteínas supressoras de tumores envolvidas nos processos de reparação do DNA, especialmente os mecanismos altamente complexos de reparação de rutura da dupla cadeia do DNA [11,15].

2.2.1 A mama

As mamas são órgãos pares formadas por tecido glandular, tecido fibroso de conexão e tecido adiposo, sendo suportadas na sua posição por um grupo de ligamentos que conferem mobilidade e sustentação, designados ligamentos de *Cooper* [16].

Externamente, em ambos os sexos, a mama apresenta na região central uma saliência, o mamilo, rodeado por uma aréola circular pigmentada. Na mulher, o órgão encontra-se mais desenvolvido, atingindo a sua maior atividade durante a gravidez e período de lactação [16–18].

No interior da mama localizam-se as glândulas mamárias, que produzem e segregam leite [16–18]. Cada glândula mamária é, habitualmente, constituída por 15 a 20 lobos envolvidos por uma quantidade considerável de tecido adiposo, que confere à mama a sua forma característica [17–19]. Estes lobos, formados por um conjunto de lóbulos, são as unidades de funcionais. Cada lobo possui um único canal galactóforo, que termina à

superfície do mamilo. Este canal dilata-se para formar a ampola galactófora, onde se acumula o leite, quando produzido. O canal subdivide-se para formar canais mais pequenos, cada um dos quais drena um lóbulo. Dentro de cada lóbulo, os canais ramificam-se e tornam-se ainda mais pequenos. Na fase de secreção, as terminações destes canalículos, dilatam-se em sacos secretores, designados alvéolos [17–19].

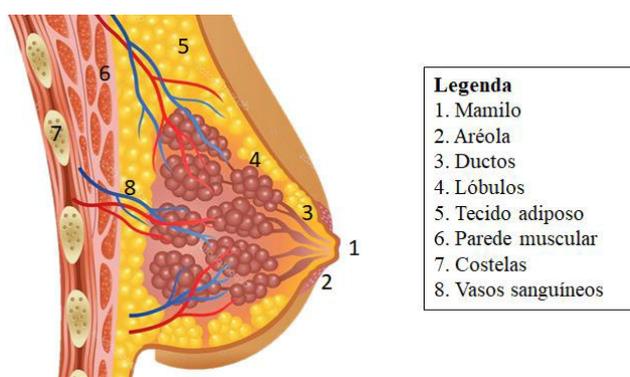


Figura 1 – Imagem que ilustra as componentes anatómicas da mama (adaptada da *American Cancer Society* [20]).

Quanto à histologia do tecido mamário, podem considerar-se duas componentes [21,22]:

- *componente estrutural*: o estroma mamário é responsável pela sustentação e proteção da estrutura mamária, dividindo-se em estroma interlobular e intralobular. O estroma interlobular é composto principalmente por tecido conjuntivo denso fibroso e tecido adiposo, que dão a firmeza à mama. Já o estroma intralobular é composto por tecido conjuntivo laxo com células inflamatórias, os linfócitos, e é muito sensível às variações hormonais do ciclo menstrual. Além disso a composição do estroma mamário varia com o passar dos anos, aumentando a quantidade de tecido adiposo e, diminuindo a proporção de tecido conjuntivo;

- *componente funcional*: o parênquima mamário é responsável pela produção e secreção do leite, sendo constituído por células epiteliais. Os lóbulos mamários são estruturas de contorno circular, formados pelo agrupamento de ácinos e ductos circundados pelo estroma interlobular. Os ácinos e os ductos são compostos por dois tipos de células de revestimento. O revestimento interno é formado por células epiteliais, que nos ácinos segrega o leite, e o revestimento externo é formado por células mioepiteliais responsáveis pela contração, de modo a expelir o leite produzido.

De salientar que a distribuição dos tecidos - conjuntivo denso e laxo, epitelial e adiposo - depende do ciclo hormonal, idade, alimentação e, principalmente, de fatores genéticos [21].

A drenagem linfática mamária, que retém as bactérias e as células cancerígenas, é feita, em grande parte, para os gânglios linfáticos axilares (75%), sendo a restante drenada para os linfonodos mamários internos (20%) e linfonodos intercostais posteriores (5%) [17].

2.2.2 Classificação do cancro da mama

O cancro da mama não constitui uma única doença, é heterogênea, apresentando diferentes características fenotípicas a nível histológico, molecular e clínico, nomeadamente no que se refere ao curso da doença e resposta à terapêutica [23–26]. Apesar de ser comum estratificar e tratar os tumores da mama como uma entidade única, as informações do meio intratumoral permitem criar um novo sistema de classificação que reflete essa heterogeneidade, uma vez que, dentro de um tumor, podem coexistir múltiplos subtipos [24–26]. A compreensão dessa heterogeneidade possibilita o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, que visam obter melhores respostas a nível clínico [23–26].

Assim, a classificação deve englobar aspetos como: o **tipo histológico**, o **grau**, o **estado dos recetores hormonais e expressão do gene *HER2*** e o **estadiamento** [23–27].

- Histopatologia

Os tumores malignos da mama são predominantemente carcinomas, cancros derivados do tecido epitelial [28,29]. Isso significa que se encontram maioritariamente nos ductos ou nos lóbulos, ambos compostos por tecido glandular. Apesar dos carcinomas serem considerados uma única doença, eles possuem uma ampla gama de subtipos que se diferem tanto em termos de aspeto microscópico como no comportamento biológico [28].

Os tipos mais comuns são os carcinomas do ducto e do lóbulo. Porém há que diferenciar os carcinomas *in situ* dos invasivos, uma vez que apresentam sintomas e sinais semelhantes (Tabela 1) [29].

Existem vários outros tipos histológicos de cancro de mama menos prevalentes, que incluem carcinoma tubular, carcinoma inflamatório, carcinoma micropapilar invasivo, carcinoma metaplásico, carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucinoso, carcinoma medular, entre outros [28].

Tabela 1 – Carcinomas da mama mais comuns (adaptada de [25–30])

Tipo de carcinoma	Descrição
Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)	Originado pela proliferação das células epiteliais malignas contidas no interior dos ductos mamários. <i>in situ</i> significa no local, ou seja, as células estão contidas na membrana basal do ducto, portanto não saem para fora deste para invadir outras áreas do estroma circundante; não há risco de desenvolver metástases [28,29].
Carcinoma ductal invasivo (CDI) ou Carcinoma ductal infiltrado	Tumor da mama mais comum, responsável por 70-80% dos casos [28–30]. Ao contrário do CDIS, o carcinoma invasivo pode expandir-se a todo o tecido mamário, vasos sanguíneos e vasos linfáticos mamários, formando metástases que, em última instância podem atingir outros órgãos [28].
Carcinoma lobular <i>in situ</i> (CLIS)	Há proliferação das células epiteliais presentes nos lóbulos, tipo não invasivo. Alguns investigadores afirmam que esse tipo de tumor confere um risco aumentado de desenvolver o tipo invasivo [29].
Carcinoma lobular invasivo (CLI)	Segundo tipo mais frequente de cancro da mama (15-55% dos casos) [25,27,30]. Em comparação com o CDI, apresenta uma maior frequência de bilateralidade e multicentricidade. A falta de coesão celular facilita a metastização para outras áreas do organismo, como medula óssea, cérebro, ovário, útero [28].

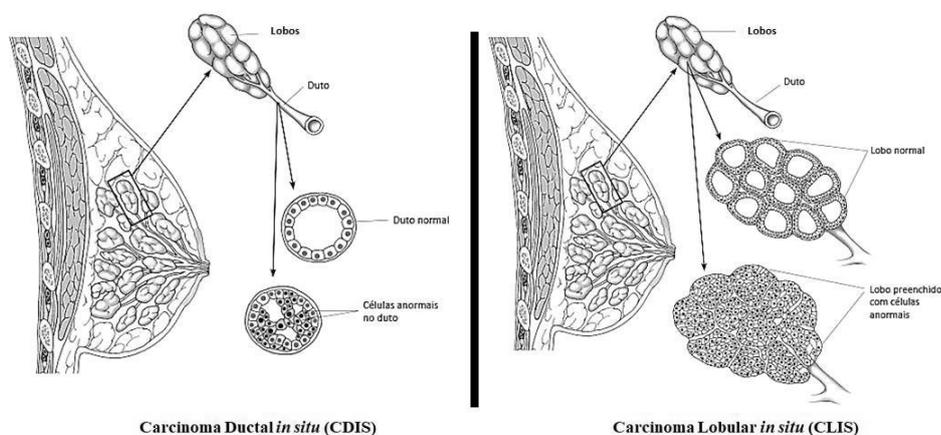


Figura 2 – Imagem ilustrativa da transformação de ductos e lóbulos normais em cancerígenos pelo crescimento anormal das células que revestem a sua parede interna (adaptada da *American Cancer Society* [20]).

- Estado dos recetores hormonais e *HER2*

Nos últimos anos, muitos estudos têm-se focado nas características moleculares do cancro da mama. Os avanços tecnológicos permitem correlacionar os perfis de expressão génica do cancro com a sua evolução clínica e com as respostas às terapias utilizadas [27]. Os primeiros estudos transcriptómicos baseados em *microarrays* classificaram subconjuntos

de cancro da mama utilizando genes que apresentaram uma variação na sua expressão em todos os tipos de cancro [30]. Os padrões de expressão génica que possibilitaram fazer esta classificação estão associados à expressão ou falta de expressão de várias famílias de genes principais, incluindo: genes dos recetores de estrogénio (RE) e os relacionados com os RE; genes associados a proliferação celular; genes do recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2*) e genes proximais a *HER2* (na região de amplificação do cromossoma 17, onde se localiza o gene *BRCA1*- responsável pela supressão tumoral - cujas variações levam a um risco aumentado de desenvolver cancro da mama) [31,32].

A nível molecular os cancros da mama são classificados como: luminal A, luminal B, com superexpressão de *HER2*, *basal-like* ou “basalóide”, *normal-like* ou “mama-normal *símile*” (Tabela 2) [30,33,34].

Tabela 2 - Subtipos moleculares do cancro da mama (adaptado de [35–37])

Subtipos moleculares cancro da mama	Estado recetores hormonais	Estado do <i>HER</i>
Luminal A	RE+ e/ou RP+	<i>HER2</i> -
Luminal B negativo <i>HER2</i>	RE+ e/ou RP+	<i>HER2</i> -
Luminal B positivo <i>HER2</i>	RE+ e/ou RP+	<i>HER2</i> +
<i>HER2</i> positivo não luminal	RE- e RP-	<i>HER2</i> +
<i>Basal-like</i>	RE- e RP-	<i>HER2</i> -
<i>Normal-like</i>	RE- e RP-	<i>HER2</i> -

Os subtipos que apresentam elevado número de recetores hormonais, têm o seu crescimento e multiplicação estimulados por hormonas, nomeadamente estrogénio e progesterona, ou seja, apresentam recetores de estrogénio (RE) e recetores de progesterona (RP). Além de que, aqueles que têm maior expressão desses recetores têm melhor prognóstico, uma vez que respondem bem à terapia hormonal [38].

A *HER2* é uma proteína situada na superfície da membrana celular, envolvida no crescimento e na migração celular, que está presente em aproximadamente 20% dos casos de cancro da mama. Nestes casos verifica-se a superexpressão e/ou amplificação do gene *HER2* [39,40].

Os subtipos moleculares Luminal A e Luminal B são assim designados devido à similaridade que as células neoplásicas têm com as células mamárias normais que estão em contacto direto com o lúmen dos ductos mamários, as ditas células luminais (Tabela 3) [40].

Tabela 3 – Descrição dos subtipos moleculares do cancro da mama (adaptada de [32,34,41–49]).

<i>Subtipo molecular do cancro da mama</i>	<i>Descrição</i>
<i>Luminal A</i>	Corresponde a cerca de 60% dos casos, mas apresenta um melhor prognóstico comparado com os demais. São tumores que maioritariamente apresentam recetores para estrogénio (RE) e/ou progesterona (RP), negativos para amplificação e/ou superexpressão de <i>HER2</i> e um baixo grau histológico [41]. Além disso, alguns estudos apontam para outros marcadores como o Ki67, um biomarcador utilizado para medir e monitorar a proliferação tumoral que, usando testes imuno-histoquímicos, apresenta um índice inferior a 14% [42].
<i>Luminal B</i>	Expressa recetores hormonais (RE e RP), dependendo da especificação, apresenta ou não <i>HER2</i> , tendo altos índices de proliferação (> 14% Ki67). Esse alto índice de proliferação tem como consequência um pior prognóstico comparado com o Luminal A. Está associado também a um maior risco de recorrência e maior resistência a tratamentos [43,44].
<i>Superexpressão HER2</i>	Tem elevada expressão da oncoproteína <i>HER2</i> , mas é negativo para os recetores hormonais [45]. Possui o segundo pior prognóstico em relação aos outros subtipos [46]. Quanto ao marcador de proliferação, ki67, não apresenta um padrão.
<i>Basal-like ou “Basalóide”</i>	Caracteriza-se pela expressão de genes expressos nas células basais/mioepiteliais [47]. Devido à ausência de marcadores RE, RP e <i>HER2</i> são chamados por alguns autores, “ <i>tumores triplo negativos</i> ” (TTN) [48]. Morfológicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pela infiltração linfocitária. Apresenta um prognóstico mais reservado [47].
<i>Normal-like ou “mama-normal símile”</i>	Carateriza-se pela elevada expressão de genes que são comuns às células epiteliais normais da mama, às adiposas e outras células do estroma [33]. É negativo para os marcadores hormonais e <i>HER2</i> ; possivelmente representa apenas uma contaminação do tecido mamário normal durante a realização das análises de perfil de expressão génica [32,49].

- Grau histológico

A classificação do cancro da mama, com base no grau histológico ocorre de acordo com a heterogeneidade, ou seja, com a diferenciação das células que formam o tumor, com a sua arquitetura e número de mitoses. Porém, o grau de diferenciação do tumor pode variar de acordo com a área analisada e alguns podem mesmo modificar o seu grau à medida que evoluem (Tabela 4) [50].

A nível clínico quanto menor for a diferenciação mais rápido é o crescimento do tumor. Assim quanto menor for o grau, melhor o prognóstico [50].

Tabela 4 – Grau histológico de diferenciação do cancro da mama (adaptado de [50,51]).

<i>Grau histológico de diferenciação</i>	<i>Descrição</i>
Grau 1	Tumor bem diferenciado: composto por células pouco heterogêneas, com preservação da arquitetura e mitoses reduzidas.
Grau 2	Tumor moderadamente diferenciado. Medeia entre o grau 1 e 3.
Grau 3	Tumor indiferenciado caracterizado pela elevada heterogeneidade das células, pela perda da estrutura e elevado número de mitoses.

- Estadiamento

Embora exista uma miríade de tumores malignos da mama, todos tendem a seguir um percurso biológico mais ou menos comum, iniciando-se pelo crescimento e invasão local, depois invadindo os órgãos mais próximos e, por fim, fazendo a disseminação regional e sistêmica. Neste contexto desenvolveu-se um sistema de estadiamento. Normalmente é utilizado o sistema de estadiamento TNM, que combina o tamanho do tumor (T), a extensão da disseminação em linfonodos (N) e a presença ou não de metástases (M) noutros órgãos. Neste sistema classifica-se o cancro em diferentes estádios (Tabela 5) [29,50].

Tabela 5 – Classificação TNM do cancro da mama (adaptada de [28,32]).

Tumores	Tamanho do tumor	Nódulos	Metástases
T0/Tis	T0: não há tumor primário Tis: tumor apenas nos ductos ou lóbulos	N0: metástase linfática não presente	M0: não há evidência de metástases
T1	≤ 2cm	N1: Células malignas presentes em 1 a 3 linfonodos axilares	M1: evidência de metástases
T2	2 – 5cm	N1 mi: Tumor no linfonodo > 0,2 mm < 2 mm	
T3	≥ 5cm	N2: Células malignas presentes em 4 a 9 linfonodos axilares	
T4	Qualquer tamanho; atinge a parede torácica ou pele ou apresenta ulceração	N3: Células malignas em linfonodos infraclaviculares ou supraclaviculares, ou em + de 10 linfonodos axilares	

A combinação das diversas variantes de T, N e M, determina os estádios clínicos que variam entre I e IV, na maioria dos casos, isto porque alguns dos tumores só são classificados em três estádios (Tabela 6) [50].

Tabela 6 - Classificação do cancro da mama em estádios (adaptada de [52–55]).

	Estádio	Descrição
Estádio 0	(Tis,N0,M0)	Carcinoma <i>in situ</i> em que as células cancerígenas estão confinadas na mama. Não se espalharam e nem invadiram outros tecidos.
Estádio I	Estádio IA (T1,N0,M0)	Tumor com menos de 2 cm e não apresenta aglomerados nos nódulos linfáticos;
	Estádio IB (T0 ou T1,N1mi,M0)	Não inclui tumor na mama, mas existem pequenos grupos de células cancerígenas nos linfonodos. Também pode ser um tumor com menos de 2 cm e com pequenos aglomerados nos nódulos linfáticos.
Estádio II	Estádio IIA (T0 ou T1 ou T2, N0 ou N1, M0)	Não inclui tumor na mama, mas existe cancro (> 2 mm) em linfonodos. Também pode ser um tumor com menos de 2 cm e o cancro já se ter disseminado para os nódulos linfáticos das axilas ou tem entre 2 e 5 cm e não se espalhou para os nódulos linfáticos axilares.
	Estádio IIB (T2 ou T3, N0 ou N1, M0)	Tumor de 2 a 5 cm que já se disseminou para os nódulos linfáticos das axilas ou é maior que 5 cm e ainda não se espalhou.
Estádio III	Estádio IIIA (T0 a T3, N1 ou N2, M0)	Tumor <5 cm disseminado para os gânglios linfáticos das axilas ou retroesternais. Pode ter + 5 cm e ter-se espalhado para os gânglios linfáticos das axilas ou para os localizados retroesternais.
	Estádio IIIB (T4, N0 a N2, M0)	Tumor de qualquer tamanho que cresceu na parede torácica e/ou pele, além de que já pode ter-se disseminado para gânglios linfáticos da axila ou retro esternais.
	Estádio IIIC (qualquer T, N3, M0)	Tumor de qualquer tamanho disseminado para os gânglios linfáticos retroesternais e axilares. O cancro pode ter atingido os gânglios linfáticos supra ou infra claviculares.
Estádio IV	(qualquer T, qualquer N, M1)	Tumor de qualquer tamanho; células cancerígenas disseminadas para outras partes do organismo, como pulmões, fígado, ossos ou cérebro.

2.2.3 Patogénese do cancro da mama

Presentemente persistem duas teorias hipotéticas que explicam a iniciação e progressão do cancro da mama: a *teoria das células-tronco cancerígenas* e a *teoria estocástica* [8,56]. Por um lado, a *teoria das células-tronco cancerígenas* sugere que todos os subtipos de tumor são derivados das mesmas células-tronco ou células progenitoras. Sugere ainda que as mutações genéticas e epigenéticas adquiridas pelas células estaminais ou células progenitoras conduzem a diferentes fenótipos tumorais (A). Por outro lado, a *teoria estocástica* sugere que cada subtipo de tumor tem início a partir de um único tipo de célula (célula-tronco, célula progenitora ou célula diferenciada) e que as mutações aleatórias acumuladas ao longo do tempo em qualquer célula mamária, levam à sua transformação em células tumorais quando as mutações adequadas se acumulam (B). No entanto, apesar de

ambas serem suportadas por uma enorme quantidade de dados, não conseguem explicar completamente a origem do cancro da mama (Figura 3) [8,56].

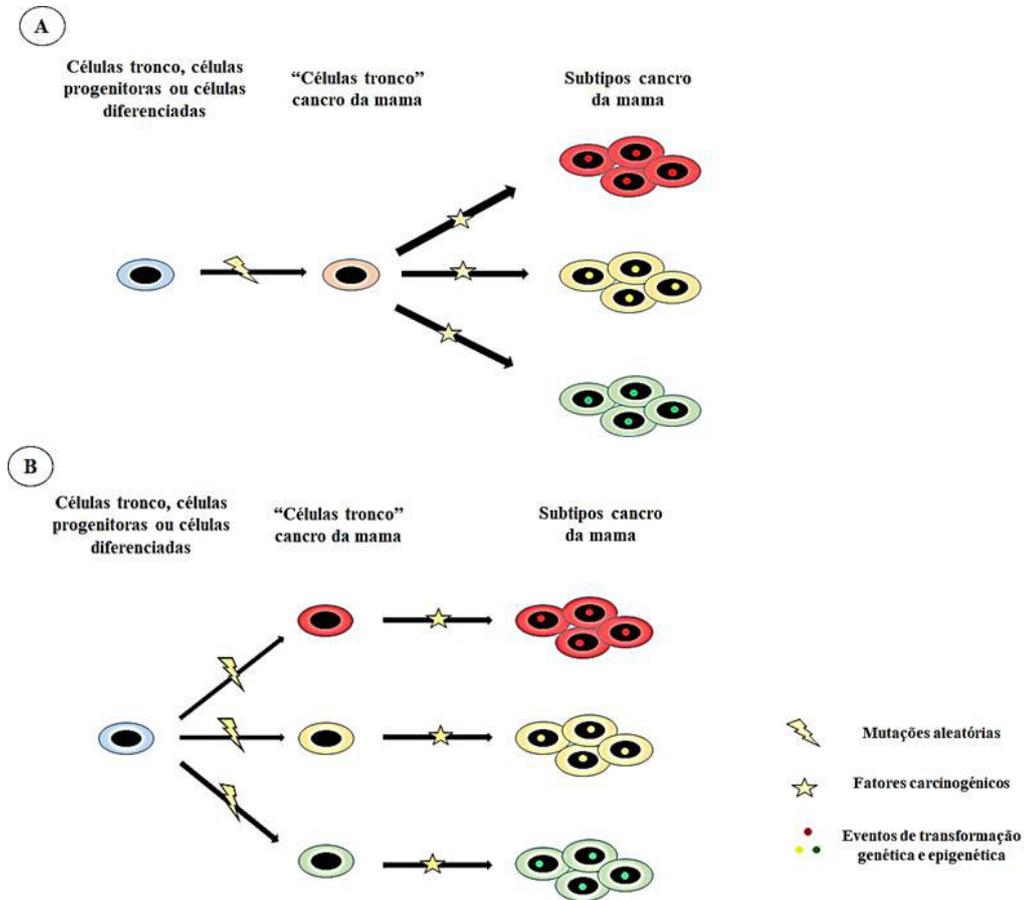


Figura 3 – Esquema ilustrativo as duas teorias hipotéticas sobre a iniciação e progressão do cancro da mama. **[A]** Todos os subtipos do cancro da mama são derivados das mesmas células-tronco ou células progenitoras e os diferentes fenótipos dos tumores devem-se a eventos de transformação específicos do subtipo. **[B]** Cada subtipo do cancro da mama tem início a partir de um único tipo de célula (célula-tronco, célula progenitora ou célula diferenciada). Mutações aleatórias podem acumular-se gradualmente em qualquer célula da mama, levando à sua transformação em células tumorais quando acumula um determinado número de mutações (adaptado de [8,56]).

2.2.4 Fatores de risco

O risco de desenvolver cancro da mama é condicionado por numerosos fatores genéticos, reprodutivos, ambientais, de género, familiares, etários, étnicos e pela escolha do estilo de vida (por exemplo: hábitos alimentares) que, de alguma forma, levam à incapacidade de reparação dos danos do DNA [54,57].

Relativamente ao género, o cancro da mama é 100 vezes mais comum no sexo feminino do que no sexo masculino [54,57].

A presença de cancro da mama em qualquer parente feminino de primeiro-grau, em geral, quase duplica o risco e este aumenta gradualmente com o número de familiares afetados, sendo esta suscetibilidade genética parcialmente atribuída a mutações nos genes relacionados com o cancro da mama e dos ovários - *BRCA1* e *BRCA2* - que podem inibir a capacidade do organismo para proteger e reparar o DNA. Há outros pontos de vista que indicam que o aumento do risco também pode ter a ver com a proximidade familiar e, com a partilha de estilos de vida [54,57].

A idade é o maior fator de risco do cancro da mama, pois estudos demonstraram um aumento da incidência com o aumento da idade. Cerca de 75% dos casos são diagnosticados após os 50 anos e 4% antes dos 40 anos, sendo raros os casos antes dos 25 anos [54,57].

Fatores reprodutivos como menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia da primeira gravidez e baixa paridade estão relacionados com o aumento do risco, devido à forte associação do estado dos recetores de estrogénio. O estrogénio tanto endógeno como exógeno está associado ao risco de cancro da mama [54,57].

Os estilos de vida modernos, como uma dieta pobre e ingestão excessiva de gorduras, a falta de atividade física, o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, a exposição a produtos químicos e toxinas estão também associados ao elevado risco de cancro da mama [54,57].

Apesar de haver diferentes taxas de incidência na idade pós-menopausa entre as diferentes etnias, estudos mostraram que com a migração para um país de alta incidência a descendência acaba por adquirir o perfil de risco do país adotivo após algumas gerações. Este facto sugere que, para além dos fatores genéticos, os fatores ambientais são subjacentes quando se considera a etnia [54,57].

2.2.5 Epidemiologia

Com base nas estimativas do GLOBOCAN, em 2012 calculou-se que havia aproximadamente 1,7 milhões de casos, sendo 521 900 mortes atribuídas ao cancro da mama. Assim, este é o cancro mais diagnosticado e a principal causa de morte por cancro nas mulheres em todo o mundo. Isoladamente ele representa 25% de todos os casos de cancro e é responsável por 15% das mortes por esta patologia nas mulheres [58].

Cerca de 50% dos casos e 38% das mortes concentram-se nos países mais desenvolvidos. Encontram-se altas taxas de incidência nos países da América do Norte, Austrália/Nova Zelândia e Europa do Norte e Ocidental; existe uma taxa intermédia na Europa Central e Oriental, América Latina e Caribe; sendo menor a taxa na maior parte da África e Ásia. As variações na taxa de incidência correlacionam-se com as diferenças relativamente à disponibilidade de deteção precoce e aos fatores de risco [58].

Houve um aumento de 30% da taxa de incidência nos países ocidentais entre 1980 e finais dos anos 90, provavelmente devido a mudanças no que se refere à saúde reprodutiva e ao aumento do rasteio. No entanto, já no início do ano 2000, a taxa de incidência decresceu, talvez pela redução da terapia hormonal da menopausa ou também talvez devido a planaltos na participação na triagem mamográfica. Por outro lado, a taxa de mortalidade estabilizou ou decresceu desde 1990, nos países da América do Norte e países da Europa com maiores recursos, graças à deteção precoce e melhorias no tratamento [58].

Mais recentemente a taxa de incidência tem vindo a aumentar em países da América Latina, África e Ásia, não sendo as causas deste fenómeno completamente compreendidas. Mesmo assim este aumento é atribuído a fatores como a evolução nos padrões reprodutivos, a obesidade e ao sedentarismo, entre outros. A taxa de incidência tem sido acompanhada igualmente por um aumento na taxa de mortalidade, possivelmente devido a mudanças no estilo de vida, escassez de programas eficazes de rastreio e, também, devido a limitações no acesso ao tratamento [58].

2.2.6 Terapêutica do cancro da mama

Fatores essenciais para determinação do tipo de terapêutica mais adequada são a idade do doente, o estado pré ou pós-menopáusico, o estadiamento da doença e o subtipo molecular (Tabela 7) [59].

Tabela 7 - Tratamento do cancro da mama de acordo com o estadiamento da doença (adaptado de [59,60]).

Estadiamento		Opções terapêuticas
Estádio 0	Cirurgia e radioterapia	Em casos de cancro com RE+ pode incluir ainda a terapêutica hormonal antiestrogénica.
Estádio I	Cirurgia e radioterapia	Caso apresente RE+ pode incluir ainda a terapêutica hormonal antiestrogénica. Caso apresente igualmente a presença de <i>HER2+</i> o tratamento incluirá a administração de terapia anti <i>HER2</i> . Pode ainda ponderar-se a aplicação de quimioterapia.
Estádio II	Cirurgia, radioterapia e geralmente quimioterapia	Em caso de RE+ pode incluir terapêutica hormonal antiestrogénica. Caso apresente <i>HER2+</i> inclui-se igualmente a terapia anti <i>HER2</i> .
Estádio III	Cirurgia, radioterapia e quimioterapia;	Em caso de RE+ aplica-se a terapêutica hormonal antiestrogénica. Para as <i>HER2+</i> aplica-se a terapêutica anti <i>HER2</i> .
Estádio IV	Neste estágio o tratamento é individualizado	Recorre-se neste caso à terapêutica sistémica incluindo terapêutica antiestrogénica, terapêutica anti <i>HER2</i> ou quimioterapia.

Existem várias maneiras de tratar o cancro da mama dependendo do tipo e estágio [61]:

- **tratamentos locais** - tratam o tumor sem afetar o resto do organismo. Os tipos de terapia local usados incluem: *cirurgia e radioterapia*;
- **tratamentos sistémicos** – tratam o tumor com fármacos que atingem as células cancerígenas em quase qualquer parte do organismo. Dependendo do tipo do cancro da mama, diferentes tipos de fármacos podem ser administrados: *quimioterapia, terapia hormonal e terapia direcionada*.

Os procedimentos cirúrgicos mais frequentemente realizados são a mastectomia total e a cirurgia conservadora da mama seguida de radioterapia [59].

A radioterapia é uma terapêutica loco-regional, sendo parte integrante do tratamento após cirurgia conservadora. É aplicada após mastectomia com o objetivo de reduzir as recidivas loco-regionais e aumentar a sobrevivência. Para tumores localmente avançados, sem condições cirúrgicas, pode ser aplicada após terapêutica sistémica neoadjuvante, a título pré-operatório ou como tratamento loco-regional definitivo [59,62].

A quimioterapia é um tratamento com fármacos citotóxicos que podem ser administrados por via intravenosa ou por via oral. A quimioterapia sistémica consegue atingir as células cancerígenas em todo o organismo através da corrente sanguínea. Estes

fármacos são comumente denominados de acordo com a sua ação ou pela sua origem (Tabela 8) [63,64].

Tabela 8 – Fármacos utilizados em quimioterapia do cancro da mama (adaptada de [65]).

Classe	Nome químico	Ação
Antraciclínas	Doxorrubicina Epirubicina	Agem diretamente sobre os ácidos nucleicos funcionando como intercalantes, danificam o material genético destas células.
Alquilantes	Ciclofosfamida	Agem sobre a síntese do DNA e proteínas, ligando-se ao DNA e inibem a abertura da dupla hélice.
Antimetabolitos	5-fluorouracilo Capecitabina	Atuam inibindo enzimas envolvidas na síntese do DNA e proteínas.
Taxanos	Paclitaxel Docetaxel	Inibidores da mitose celular ao promoverem a formação dos microtúbulos ao inibirem a despolimerização de tubulina, o que estabiliza os microtúbulos.
Alcaloides de vinca	Vincristina	Inibe a mitose celular, porém através da inibição da formação de microtúbulos, ao ligar-se à β -tubulina e bloquear a polimerização da α -tubulina.
Antibióticos	Mutamicina	Atua intercalando-se na estrutura da dupla hélice;
À base de platina	Carboplatina	Atua formando ligações cruzadas nas cadeias do DNA, inibindo a sua replicação e transcrição.

Contrariamente aos agentes quimioterapêuticos, que atacam todas as células com crescimento rápido, os investigadores têm desenvolvido fármacos específicos para o tipo de cancro, graças aos estudos detalhados sobre as alterações nas células cancerígenas que as faz proliferar descontroladamente. Os novos fármacos direcionados atuam especificamente nas células cancerígenas bloqueando o seu crescimento e disseminação [66,67].

A terapia direcionada para cancro da mama *HER2* + (1/5 casos cancro da mama) utiliza anticorpos monoclonais e inibidores de cinases com o objetivo de atacar a proteína. No cancro da mama positivo para os recetores hormonais (2/3 casos cancro da mama) completa-se com a terapia hormonal antiestrogénica, usando bloqueadores de proteínas cinases dependentes de ciclinas e *mTOR* (do inglês, *mammalian target of rapamycin*), com a intenção de limitar o crescimento tumoral. Para os casos de mutação no gene *BRCA* utilizam bloqueadores da proteína *PARP* (do inglês, *poly (ADP-ribose) polymerase*) conduzindo as células à morte [66].

Durante a realização deste trabalho foram utilizados alguns agentes quimioterapêuticos, nomeadamente:

- da família dos taxanos:

- ✓ Paclitaxel – impede a divisão celular ao ligar-se à tubulina dos microtúbulos fixando-os, impossibilitando a célula de usar o seu citoesqueleto de maneira flexível [68];
 - ✓ Docetaxel – inibe a despolarização da tubulina que leva a um acúmulo de microtúbulos dentro da célula [69].
- entre as antraciclinas utilizaram-se:
- ✓ Doxorubicina - interage com o DNA por intercalação e inibição da biossíntese macromolecular, podendo mesmo induzir a remoção de histonas da cromatina transcricionalmente ativa [70];
 - ✓ Epirubicina – atua intercalando as cadeias do DNA inibindo a síntese de DNA e RNA e, pode ainda, gerar radicais livres [71].
- dos antimetabólicos:
- ✓ 5-fluoruracilo – interfere com a síntese do DNA e inibe em um pequeno grau a formação de RNA ao desencadear um desequilíbrio metabólico [72];
 - ✓ Capecitabina – a sua biotransformação enzimática produz metabólitos que podem inibir a divisão celular, interferir com o processamento do RNA e síntese proteica [73].

2.2.7 Modelo *in vitro* - linha celular MCF-7

As células do cancro da mama utilizadas para realização deste trabalho, com o acrónimo de MCF-7 - *Michigan Cancer Foundation-7*, foram adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC® HTB – 22™, Rockville, Md., USA).

É uma linha celular amplamente estudada derivada de adenocarcinoma mamário, que mantém as características de epitélio mamário diferenciado, incluindo a capacidade de processar o estradiol através de recetores citoplasmáticos de estrogénio, ou seja, positiva para o RE e também positiva para o RP e negativo para *HER2* [74]. Deste modo, enquadra-se no subtipo molecular de cancro da mama Luminal A, mais especificamente carcinoma ductal luminal A. Geralmente estas células são de crescimento lento porém muito fáceis de dissociar, o que explica a capacidade de formar metástases [74,75].

- Resenha histórica

Em 1963, a Irmã Catherine Frances Mallon (*Immaculate Heart of Mary Convent, Monroe, Michigan*) foi diagnosticada com um tumor benigno na mama direita que foi removido. Em 1967, realizou uma mastectomia para retirar um adenocarcinoma na mama esquerda. Depois de completar a radioterapia pós-operatória, apresentou uma recorrência local na área do tórax esquerdo, no entanto conseguiram controlar a recorrência com radioterapia e terapia hormonal durante 3 anos [76,77].

Porém, em 1970, desenvolveu doença metastática para a pleura e parede torácica. Entretanto, a partir de um nódulo da parede torácica e de um derrame pleural, o investigador Herbert D. Soule da *Michigan Cancer Foundation* tentou desenvolver uma linha celular do cancro da mama. Após várias tentativas as células derivadas da pleura cresceram e formaram uma monocamada que cresceu como uma cultura contínua. Desse modo, a linha celular resultante foi chamada MCF-7, *Michigan Cancer Foundation*, e representou a sétima tentativa de Soule de criar uma linha celular do cancro da mama [76,77].

- As MCF-7 e os recetores de estrogénio

As MCF-7 têm servido de modelo para o estudo da resposta ao estrogénio. Devido à expressão de níveis substanciais de recetores de estrogénio as MCF-7 permitem imitar a maioria dos cancros invasivos que possuam RE, dando assim um grande contributo para estudos *in vitro* e *in vivo* do cancro da mama [77].

A determinação do mecanismo que expressa a influência que o estrogénio exerce sobre o crescimento das células MCF-7 continua em estudo. Uma das características principais para compreender como o estrogénio regula o ciclo celular destas células, seria a regulação da sinalização e da ação do fator de crescimento pelo estrogénio [78]. Todavia estudos recentes demonstraram que o estrogénio induz e inibe, simultaneamente, um grande número de genes, isto é, a alteração do crescimento é coordenada por uma rede complexa de mudanças [79].

2.3 Metabolitos naturais – novas abordagens na luta contra o cancro

Compostos biologicamente ativos são produzidos por uma grande variedade de organismos, tais como microrganismos, plantas, fungos, líquenes e animais. Muitos destes compostos apresentam alguma atividade anticancerígena. Os compostos bioativos como os polifenóis, terpenóides, alcalóides e sulfidrilo, são metabolitos secundários produzidos por diversas espécies de plantas, que têm sido utilizados em estudos de tratamento e prevenção do cancro [80].

As plantas fornecem uma quantidade infinita de metabolitos secundários ou fitoquímicos, que cada vez mais são estudados como possíveis agentes anticancerígenos. Os polifenóis vegetais abrangem uma grande diversidade química, complexidade estrutural, fácil acessibilidade, falta de efeitos tóxicos e atividades biológicas inerentes que os tornam candidatos para novas abordagens terapêuticas [81].

Há evidências de que os agentes fitoquímicos alimentares têm a capacidade de influenciar o tratamento com agentes quimioterapêuticos e ajudar na cura de doentes com cancro. Podem melhorar a eficácia dos agentes quimioterapêuticos, diminuir a resistência aos fármacos administrados, reduzir e aliviar os efeitos secundários da quimioterapia. Deste modo, têm vindo a realizar-se estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando diferentes plantas e seus agentes fitoquímicos, para a terapia do cancro. Experimentalmente várias plantas medicinais e seus agentes antioxidantes apresentaram efeitos anticancerígenos, ou seja diminuíram a proliferação celular, induziram apoptose, retardaram o aparecimento de metástases e inibiram a angiogénese [82].

Atualmente alguns destes compostos derivados de plantas são amplamente utilizados na quimioterapia: análogos do taxol, alcalóides da vinca (vincristina, vinblastina) e análogos da podofilotoxina [82].

Dentro destes estudos surge o chá verde, uma bebida muito popular na Ásia, exibindo uma atividade biológica com potencial quimiopreventivo e quimioterapêutico [80].

2.3.1 Chá verde

Originárias da China e do Sudeste Asiático, as plantas de chá são cultivadas há milhares de anos. As folhas inicialmente foram utilizadas para fins medicinais, só mais tarde o chá se tornou uma bebida popular [83]. O consumo do chá remonta há cerca de 5 000 anos na Antiga China. Hoje em dia é a bebida mais consumida a seguir à água, fazendo parte do dia-a-dia de mais de dois terços da população mundial [84].

O chá verde, o chá preto e o *Oolong* são extraídos a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* da família *Theaceae* [85]. Estima-se que sejam produzidos em mais de 30 países, um total de 3,8 milhões de toneladas de chá anualmente. Deve, no entanto, ressaltar-se que a composição do chá varia com o clima, as práticas hortícolas, o solo, a variedade e a idade das folhas, para além dos diferentes métodos de produção que alteram a composição das folhas de chá secas [83]. O chá verde, que representa 20% do consumo de chá mundial, é produzido usando folhas recém-colhidas que são imediatamente cozidas a vapor para evitar a fermentação, resultando num produto seco e estável. Ao usar a vaporização as enzimas responsáveis pela quebra dos pigmentos da cor nas folhas são destruídas, permitindo que o chá mantenha a sua cor verde durante os processos seguintes de rolamento e secagem. Estes processos conseguem preservar os polifenóis naturais do chá verde, cujos benefícios para a saúde têm sido amplamente estudados, incluindo efeitos preventivos de vários distúrbios patológicos, principalmente o cancro [83,84,86]. À medida que o chá verde é fermentado para *Oolong* e, em seguida, para chá preto, os compostos polifenólicos sofrem alterações, originando as diferentes atividades biológicas destes chás [83,86].

Quanto à composição química o chá verde é composto por proteínas (15-20% do peso seco), aminoácidos (1-4%), fibra (26%), glúcidos (5-7%), minerais e oligoelementos (5%), lípidos (5%) e polifenóis (30%) [86]. Os polifenóis incluem flavonóis, flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos. O chá verde possui maioritariamente flavonóides, normalmente denominados catequinas [84]. No chá verde existem quatro tipos de catequinas: epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e a epicatequina. O EGCG é a catequina mais abundante, podendo representar cerca de 50-75% das catequinas deste chá [83,87,88]. Segundo vários estudos, a típica chávena de chá verde, preparada com 200-250 ml de água quente e 2,5 g de folhas de chá, contém 620-880 mg de materiais extraíveis com água, sendo um terço catequinas e 3-6% cafeína [83].

O chá verde demonstrou ter várias atividades biológicas, incluindo antiobesidade, potente antioxidante, protetor cardiovascular e anticancerígeno. Vários estudos clínicos e pesquisas indicaram que a ingestão de extrato de chá verde poderia ajudar a reduzir o risco de doenças cardiovasculares e a diminuir a taxa de doenças cardíacas [89,90].

Está descrito que vários compostos polifenólicos extraídos das folhas do chá verde são bons antioxidantes contra a peroxidação lipídica em bicamadas de fosfolípidos e em sistemas biológicos. Além de estimular as defesas antioxidantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentam efeitos benéficos de consumo em modelos animais. Associa-se, assim, o consumo do chá verde a um menor risco de cancro, pelo importante papel na eliminação dos radicais livres que são capazes de causar danos no DNA que, em última instância, podem conduzir ao processo de carcinogénese [87].

Os efeitos inibitórios e antitumorais dos polifenóis do chá verde foram confirmados em mais de 20 linhas de células tumorais, tendo este tipo de chá inibido a carcinogénese em vários modelos animais de cancro de pulmão, pele, esófago e fígado. A infusão do chá verde como única fonte de ingestão de líquidos dos ratos diminuiu significativamente a incidência do tumor pulmonar induzida e a proliferação tumoral. Verificou-se que a administração oral de polifenóis do chá verde reduziu a incidência do cancro de pele induzida em ratos, a multiplicidade do tumor e o crescimento tumoral. O efeito inibitório dos polifenóis foi também associado à redução da expressão de fatores importantes no crescimento tumoral, metastização e angiogénese [84].

Relativamente à segurança do consumo do chá verde, dados sugerem que não existem preocupações reais com o consumo normal para a maioria das pessoas, ou seja, não apresenta toxicidade. No entanto, estudos farmacocinéticos demonstraram que existem interações entre o chá verde e o ácido fólico a nível da absorção intestinal, diminuindo a biodisponibilidade do ácido, e portanto, não é recomendado para mulheres grávidas ou doentes com anemia megaloblástica. Há ainda relatos de casos que sugerem que o teor de vitamina K no chá verde pode antagonizar o efeito anticoagulante da varfarina [90].

Beber grandes quantidades de chá pode causar problemas nutricionais e outros devido ao teor de cafeína e à forte atividade de ligação dos polifenóis que pode dificultar a absorção de alguns medicamentos e suplementos de ferro ou mesmo reverter o efeito terapêutico dos fármacos. A quantidade de informação sobre a biodisponibilidade dos compostos do chá verde após consumo em humanos é ainda limitada, sendo, necessário efetuar mais estudos

sobre a absorção, distribuição e metabolismos dos polifenóis do chá em animais e seres humanos, para que se possam compreender os seus mecanismos de ação com possíveis abordagens terapêuticas [2].

2.3.2 EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato

Estudos laboratoriais e epidemiológicos sugerem que os polifenóis do chá verde, especialmente a epigallocatequina-3-galato (EGCG), a principal catequina encontrada neste chá, apresentam poderosas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, têm efeitos preventivos contra várias doenças crônicas como as cardiovasculares, a diabetes, as doenças neurodegenerativas e, ainda, efeitos anticancerígenos [91,92].

- Efeitos anticancerígenos do EGCG

A propriedade anticancerígena do EGCG é a propriedade mais relevante para este estudo, pelo que o foco da pesquisa do estado de arte vai ser orientado neste sentido. O EGCG pode impedir a tumorigênese ao inibir a atividade carcinogénica em diversos tipos de cancro, como por exemplo do pulmão, do trato digestivo oral e da próstata [85,93]. Outros estudos sugerem que o EGCG consegue prevenir a tumorigênese hepática relacionada com a obesidade [85,94], bem como a proliferação e angiogénese que se verifica no cólon, pâncreas, mama e pele através da regulação negativa da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*, do inglês *Vascular endothelial growth factor*) [85,95–97]. Pode ainda inibir a migração e invasão tumoral por células cancerígenas da cavidade oral, do carcinoma hipofaríngeo e do cancro da mama [85]. Induz a morte das células cancerígenas por mecanismos tais como: apoptose dependente de caspases, apoptose independente de caspases, morte celular mediada por permeabilização da membrana lisossomal e autofagia [85,93].

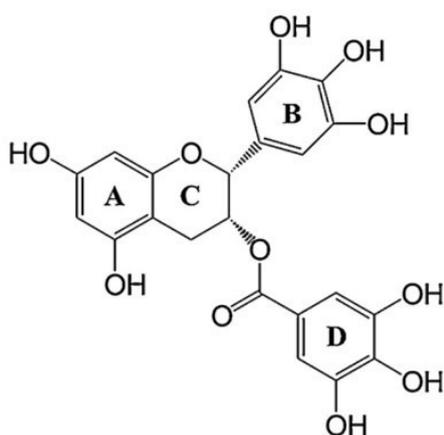
- Efeito antioxidante e pró-oxidante

Acredita-se que os efeitos preventivos em relação ao cancro ocorram devido a um pequeno número de mecanismos que afetam diferentes fatores do processo carcinogénico. Foram propostos diversos mecanismos incluindo a atividade antioxidante e, mais recentemente, o efeito pró-oxidante. Contudo, presume-se que a relevância de tais efeitos pode depender do estágio de carcinogénese [91].

O EGCG apresenta forte atividade antioxidante devido à capacidade de eliminar radicais livres já que é um forte agente quelante de íons metálicos. Esta propriedade foi observada diretamente em estudos *in vitro* e também em modelos animais e seres humanos, já que promoveu a indução de sistemas antioxidantes endógenos. Há ainda evidências de que parte desses efeitos estejam também relacionados com a indução de *stress* oxidativo. Os designados efeitos pró-oxidantes, aparentemente responsáveis pela indução da apoptose em células tumorais, podem igualmente induzir sistemas antioxidantes endógenos em tecidos normais, protegendo-os contra a agressão cancerígena [91]. Assim, o aumento da capacidade antioxidante endógena poderia ser mais relevante antes da exposição aos agentes carcinogênicos, enquanto a morte celular (induzida pelos efeitos pró-oxidantes) pode ser mais importante para eliminar as células mutadas e limitar o crescimento tumoral [91].

- Estrutura do EGCG

Atribui-se uma grande importância do EGCG na promoção da saúde à sua estrutura química, constituída por três anéis aromáticos (A, B e D) ligados entre si por um anel pirano (C). Desta forma podem efetuar-se transferências de átomos de hidrogênio ou reações de transferência de um único elétron, envolvendo grupos hidroxilo dos anéis, e fazendo com que o EGCG se ligue fortemente a proteínas e ácidos nucleicos (Figura 4) [85].



(-) – Epigallocatequina-3-galato (EGCG)

Figura 4 – Estrutura química da epigallocatequina-3-galato (adaptado de [85])

- Biodisponibilidade do EGCG

No que se refere à biodisponibilidade do EGCG, estudos farmacocinéticos pré-clínicos indicam que o EGCG tem baixa biodisponibilidade oral, tanto em roedores como em seres humanos. A baixa disponibilidade está, provavelmente, ligada à sua baixa solubilidade no fluido gastrointestinal, absorção lenta e difícil, rápido metabolismo e sistema de eliminação e distribuição tecidual. Outro fator que leva a uma baixa biodisponibilidade é a instabilidade do EGCG em meio neutro ou alcalino, pois o meio básico favorece a sua autooxidação que gera aniões superóxido e peróxido de hidrogénio. Deste modo, muitos dos seus efeitos poderiam ser atribuídos à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) [2].

Os níveis sanguíneos de EGCG devido ao consumo de chá em humanos e em animais aos quais se administraram preparações de chá - o equivalente a duas chávenas de chá – determinados em estudos de prevenção do cancro são geralmente inferiores a 0,5 μM . Quando foram administradas doses maiores por via oral observaram-se concentrações de 5 a 7 μM [83].

Estudos com voluntários humanos demonstraram que a concentração plasmática máxima de EGCG foi detetada entre 1,4 - 2,4 horas após a ingestão da preparação de chá, com um tempo de meia-vida de 5 – 5,5 horas e foi excretado maioritariamente pela bÍlis para as fezes. Em experiências com ratos e ratinhos que também beberam chá verde, a distribuição de EGCG foi observada em múltiplos tecidos, tendo sido as maiores concentrações detetadas no intestino grosso, para além de concentrações significativas nos rins, próstata e pulmões. Por outro lado, estes estudos sugerem que o consumo frequente de chá verde ajudaria a manter um alto nível de EGCG [85,98–100].

Quanto à transformação dos polifenóis sabe-se que são metilados pela *S-adenosil-metionina*, que é catalisada pela enzima *catecol-O-metiltransferase* (COMT), e também são catalisados por *UDP-glucuroniltransferase* (UGT) e pela *sulfotransferase* (SULT), para formar os correspondentes conjugados de glucuronido e sulfato de catequinas. Adicionalmente os metabolitos da fissão do anel são produzidos pela microflora intestinal, pois os humanos e os ratinhos não dispõem de enzimas capazes de catalisar a fissão do anel pirano C e para hidrolisar a ligação éster do EGCG [83]. Assim sendo, a chave para a compreensão da biodisponibilidade do EGCG estaria em perceber os seus mecanismos biológicos [85].

- EGCG e o cancro da mama

Farabegoli *et al.* realizaram estudos *in vitro* que revelaram que em baixas concentrações o EGCG (20 – 200 µg/ml) são citotóxicas para células MCF-7, e a combinação de EGCG em maiores concentrações com tamoxifeno-4-OH promoveu citotoxicidade sinérgica em células do cancro da mama MDA-MB-231, sem recetores de estrogénio α . Isso confirma não só a eficácia da ação do EGCG sobre as células do carcinoma da mama com recetores de estrogénio, mas também que o tratamento com EGCG pode matar células de carcinoma da mama sem recetores de esteróides e resistentes a fármacos utilizados na sua terapia [92].

Abd El-Rahman *et al.* conduziram um estudo *in vivo* com o objetivo de investigar os efeitos do EGCG (30 mg/kg) em 3 grupos de ratos *Sprague Dawley* fêmeas virgens com cancro da mama induzido por 7,12-dimetil-benzantraceno (DMBA). Como terapia usaram o EGCG, o paclitaxel e a sua combinação. O EGCG apresentou efeitos quimiopreventivo significativos e atividade anti-CSCs (*anti-cancer stem cells*) através de várias vias, incluindo uma diminuição significativa no tamanho e número de tumores nos ratos, melhora significativa das alterações dos marcadores de *stress* oxidativo, assim como inibição significativa da expressão de *CD44*, fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), *Ki-67* e *MMP-2* associada a uma expressão aumentada da caspase-3. Além disso, a combinação de EGCG e paclitaxel aumentou significativamente a eficácia anticancerígena posterior [3].

Claire Perks *et al.*, utilizando concentrações fisiológicas de EGCG (0,1 e 1 µM), conseguiram causar a inibição do crescimento das células MCF-7, associada com a regulação negativa do recetor de estrogénio α (RE α) e redução da *IGFBP-2* (*insulin-like growth factor binding protein-2*). Demonstraram como o novo regulador positivo do RE α promove a morte das células cancerígenas RE α positivas e aumenta a expressão dos genes supressores de tumores *p53/p21*. Já com a linha celular T47D RE α positiva e com *p53* mutada, viram que aplicado isoladamente o EGCG não teve efeitos significativos na proliferação celular ou morte, contudo o EGCG aumentou os níveis de RE α , que levou a uma melhor resposta das células ao tamoxifeno, um antagonista dos RE α . Com a linha celular MDA-MB-231 RE α negativa e com *p53* mutada o EGCG aumentou significativamente a morte celular, houve um aumento a nível do RE α e do *IGF-IR* (*insulin-like growth factor-I receptor*), aumentando assim a sensibilidades das células ao tamoxifeno e a um inibidor do IGF-IR, o α IR3. Contrariamente às mudanças significativas, em termos de moléculas-chave envolvidas no crescimento e sobrevivência induzidos pelo EGCG nas linhas celulares do cancro da mama, as células epiteliais não-malignas da mama (MCF-10A), após tratamento com concentrações

fisiológicas de EGCG, não sofreram alterações no seu crescimento, sobrevivência e nem a nível das proteínas-chave [101].

Essas características tornam o chá verde numa bebida a ser investigada como complemento de outras terapêuticas no carcinoma mamário, particularmente em relação à resistência a fármacos desenvolvidos para bloquear ou inativar recetores de esteroides α [92].

- EGCG como adjuvante

A resistência a múltiplos fármacos representa uma grande barreira para os efeitos anticancerígenos mediados por fármacos nas células cancerígenas. Vários estudos têm dado ênfase considerável ao uso do EGCG como adjuvante, em que este seria capaz de amplificar os efeitos anticancerígenos dos fármacos através da modulação farmacocinética.

Kanwar *et al.*, num artigo de revisão, citaram alguns estudos *in vivo* com células de carcinoma epidermóide oral resistente, demonstrando que a associação de doxorrubicina e EGCG aumentou em 51% a concentração da doxorrubicina nos tumores e aumentou a apoptose em comparação com a aplicação de doxorrubicina isoladamente. Relataram ainda que a combinação de EGCG e tamoxifeno aplicada em células do cancro da mama humano MDA-MB-231 induziu sinergicamente a apoptose e inibiu o crescimento das células [2].

Um outro resultado referido por Kanwar *et al.* foi que o efeito quimiossensibilizador do EGCG aumentou o potencial da cisplatina 3 a 6 vezes em células do cancro de ovário, inclusive numa linha resistente à cisplatina, sugerindo que as células do cancro do ovário são suscetíveis à atividade pró-oxidante do EGCG, conseguindo amplificar assim a toxicidade da cisplatina nessas células. A capacidade do EGCG influenciar diferentemente as células cancerígenas *versus* as células normais pode, de certo modo, reduzir a toxicidade e resistência à cisplatina, que é um grande problema no tratamento do cancro do ovário [2].

Stearns e Wang observaram os efeitos da associação do EGCG a taxanos (paclitaxel e docetaxel) na linha celular de cancro da próstata humano PC-3ML *in vitro* e *in vivo*. Relataram que a aplicação conjunta de EGCG e um taxano teve um efeito aditivo na inibição do crescimento tumoral. Não só teve um efeito aditivo na morte celular mas também aumentou a expressão dos genes pró-apoptóticos *p53*, *p73*, *p21* e caspase-3, aumentando a taxa de apoptose tanto *in vitro* como *in vivo*. A injeção intraperitoneal de EGCG e de um taxano extinguiu os tumores pré-existent e aumentou a taxa de sobrevivência dos ratos, comparativamente com a aplicação isolada dos agentes. Além disso, o tratamento combinado

bloqueou a metastização após injeção intravenosa de células PC-3ML, indicando que a combinação do EGCG com taxanos pode proporcionar uma nova terapêutica para o cancro da próstata avançado [102].

Tang *et al.* relataram que o EGCG aumentou a eficácia da gemcitabina e do CP690550 (Tasocitinib), um inibidor do oncogene *STAT3* (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), na modulação da via da *STAT3* em células do cancro do pâncreas humano (*AsPC-1* e *PANC-1*). Os resultados sugeriram que ao inibir a via mediada pela *STAT3*, o sinergismo suprimiu o crescimento, a invasão e migração das células e induziu a apoptose [103].

Esses resultados indicam uma nova metodologia de utilização, podendo o EGCG potenciar os efeitos terapêuticos dos fármacos antineoplásicos e, eventualmente, reduzir os seus efeitos colaterais.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Linha celular selecionada

Para a realização deste trabalho foi utilizada a linha celular MCF-7, células epiteliais aderentes derivadas de um adenocarcinoma humano da mama da *American Type Culture Collection* (ATCC® HTB – 22™, Rockville, Md., USA) - adquiridas pelo Instituto de Biofísica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC). As MCF-7 retêm várias características do epitélio mamário diferenciado, bem como a capacidade para processar o estradiol através de recetores citoplasmáticos de estrogénio e a capacidade de formar cúpulas [104].

A linha celular foi mantida no gelo seco de transporte o mínimo de tempo possível e foi cultivada para propagação. A partir da propagação da amostra original foram preparadas várias alíquotas (em meio DMEM com 10% de FBS e 10% de DMSO), identificadas e numeradas; foram armazenadas algumas horas a -80°C (*Thermo Scientific, Herafreeze HFUT Series*, EUA) e depois transferidas para um contentor com azoto líquido a -190°C (*ThermoNorma, Cryoplus 1*, EUA). Os criotubos devidamente identificados foram colocados em *racks* de armazenamento, assegurando a qualidade da linha celular armazenada com poucas passagens. Para períodos muito curtos de preservação, as alíquotas foram mantidas a -80°C, numa arca frigorífica dedicada apenas a este fim (*Thermo Scientific, Herafreeze HFUT Series*, EUA) regularmente revista por uma empresa certificada (*Certilab*, Portugal).

3.2 Cultura das células MCF-7

Toda manipulação das células foi realizada em ambiente da sala de cultura de células de modo a manter as condições de assepsia, essenciais à propagação e preservação das mesmas. São equipamentos indispensáveis para estes procedimentos: uma câmara de fluxo laminar vertical (*Holten Lamin Air*, HB2448), uma incubadora (*Binder*, Dias de Sousa S.A, Portugal), um microscópio ótico contraste de fase invertido (MOCF, *Nikon Eclipse*, TS100, Japão) acoplado a um sistema de fotografia digital e uma centrífuga (*Heraeus Multifuge 1L-R*). A câmara

permite trabalhar em condições de esterilidade. Quando o operador utiliza câmara também tem de garantir que todo material que entra dentro dela e que vai estar em contacto com as células está devidamente esterilizado e foi pulverizado com etanol a 75%. Além disso, para a aderência e proliferação das células é necessário um ambiente específico: temperatura de 37°C e atmosfera humidificada a 95% e com uma concentração de CO₂ de 5%. Deve assegurar-se que qualquer material que tenha estado em contacto com as células deve ser inativado com lixívia e devidamente descartados em contentores apropriados.

- Meio de cultura

O meio de cultura sugerido pelo fornecedor é o *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), com 2 mM de glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA, do inglês *Non Essential Amino Acids*), soro fetal bovino (FBS) a 10% e 1% de antibióticos de penicilina/estreptomicina (Pen/Strep), renovado entre duas a três vezes por semana [104,105].

Porém, para o trabalho foi utilizado o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (*Gibco*® 1×, 11966-025, RU) suplementado com 1% de L-glutamina (*Biowest*, LGlutamine 100×, 200mM, XO55O-100, EUA), enriquecido com FBS (*Sigma-Aldrich*®, F7524, EUA) a 10% e 1% de antibióticos Pen/Strep (*Lonza Pen Strep, Amphotericin*, B 100×, 17-745E, EUA), denominado DMEM completo [106].

O DMEM contém aproximadamente quatro vezes mais vitaminas e duas vezes mais aminoácidos, também tem sais (por ex: nitrato férrico e piruvato de sódio), além de aminoácidos suplementares (serina e glicina), aumentando, assim, a quantidade de nutrientes no meio, razão pela qual se optou por ele neste trabalho [107].

Depois de preparado o meio foi esterilizado por filtração sob vácuo na câmara de fluxo laminar. Seguidamente foi feito um teste, para ver se não havia contaminação. Se tudo estivesse correto o meio era conservado no frigorífico e antes da sua utilização era aquecido em banho de água termostaticado a 37°C (*Tissue water bath*, GFL 1002, Alemanha, certificado pela *Staff&Line*, Portugal) e suplementado com FBS a 10%.

- Descongelamento

Antes de serem utilizadas, as células encontravam-se num *criotubo*, na mistura de criopreservação meio completo DMEM e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (*SigmaAldrich*®, D2650, EUA), na câmara de azoto a -190°C. Foram retiradas da arca e transportadas em caixas

com gelo e descongeladas rapidamente em banho de água termostaticado a 37°C. Posteriormente, já na câmara de fluxo laminar, passou-se o volume do *criotubo* para um *falcon* de 15 ml (*SARSTED* 15 ml, 62.554.502, Alemanha) e adicionaram-se 2-3 ml de meio DMEM completo (isto é, DMEM com 10% de FBS, 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico Pen/Strep) para inibir a ação do agente criopreservante. Centrifugou-se o *falcon* a 1 100 rpm (rotações por minuto), durante 5 minutos a 4°C (*Thermo Scientific, Heraeus Multifuge*, 1 L-R, EUA, certificada pela *Certilab*). Em seguida, na câmara de fluxo, descartou-se o sobrenadante, removendo assim todo o meio de criopreservação. O *pellet* obtido foi ressuscitado com 1 ml de meio DMEM completo e passou-se a suspensão celular para um frasco de cultivo de 25 cm² (*Corning*, 430693, EUA), adicionando aproximadamente 15 ml de meio DMEM completo, conforme a concentração celular. Este frasco foi mantido na estufa (*Thermo eletron corporation, Hera Cell* 150, EUA) à temperatura de 37°C em atmosfera humidificada 95% e com CO₂ (5%) (*Praxair*, 28020, Espanha) e o meio foi mudado a cada 2-3 dias.

Um ponto importante a considerar é que as MCF-7 utilizadas necessitaram de um período de aproximadamente 72 horas para correta aderência e proliferação, desse modo qualquer manipulação que se pretenda fazer só pode ser executado após esse período.

- Manutenção

Diariamente verificou-se se havia necessidade de mudar o meio de cultura, através da observação das células utilizando o MOCF (*Nikon Eclipse*, TS100, Japão), até que atingissem aproximadamente 70-80% de confluência. Como o meio DMEM completo contém um indicador de pH devido à presença do vermelho de fenol, este altera a sua coloração de vermelho para alaranjado ou amarelo, quando reage com os produtos metabólicos produzidos pelas células em crescimento/proliferação, que acidificam o meio. Deste modo, a coloração do meio serve como um indicador visual da acidez do meio de cultura, característico da progressão da cultura. Foi necessário mudar o meio para eliminar estes produtos tóxicos e fornecer novos nutrientes às células. Monitorizou-se o possível aparecimento de contaminações bacterianas ao MOCF (geralmente ampliação de 200-400×), sendo de imediato descartados esses frascos.

Caso apenas houvesse necessidade de substituir o meio de cultura, com um pipetador automático (*Gilson, Pipetting Aid* 080333, França), acoplado a pipetas de *Pasteur* de vidro estéreis (*VWR*[®], *Pasteur Pipettes* 612-1702, França), aspirou-se todo o meio presente dentro do frasco de cultura, removendo assim as células em suspensão e os metabolitos. Depois

colocou-se novo meio dentro do frasco, pulverizou-se com etanol a 75% e recolocou-se na incubadora.

À medida que as células MCF-7 atingiram aproximadamente 70-80% de confluência, foram dissociadas por método enzimático e transferidas/plaqueadas para novos frascos ou placas.

- Dissociação celular

Conforme iam crescendo as células aderiam ao fundo plano do contentor e entre si. Para manter um bom ambiente de crescimento há que garantir que o número de células no frasco de cultivo não impossibilite o crescimento normal da monocamada, uma vez que estas células respondem à inibição por contacto. Quando este limite era ultrapassado, verificou-se que as células morriam pois não cresciam em amontoados, como é a situação mais comum em células tumorais. A inibição por contacto é uma via de sinalização ativada pelo glicocálice presente na parte externa da membrana celular, que emite sinais ao entrar em contacto com células do mesmo tecido, sinais estes que inibem a mitose e levam à morte celular [101].

Quando atingiam 70-80% da sua confluência máxima, ou seja, a fase exponencial do seu crescimento, avaliada através da observação microscópica, foi necessário utilizar um método para dissociação das células [98].

A dissociação pode ser efetuada por método mecânico ou enzimático. Neste trabalho utilizou-se a degradação enzimática que faz a digestão das proteínas de adesão usando proteases. As proteases são necessárias para romper a matriz extracelular e, assim, obter células individualizadas com a finalidade de as transferir para um novo frasco de cultivo ou placas de cultura.

A enzima proteolítica inespecífica utilizada foi a enzima recombinante presente no *TrypLETM Express* (Gibco[®] by life technologiesTM, Dinamarca), que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Reação similar à realizada pela tripsina, porém sem derivados de origem animal. Esta reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos recetores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, o que obriga as células a rearranjarem o seu citoesqueleto. Devido à inespecificidade da enzima, não se devem deixar as células muito tempo na sua

presença, para não haver lise celular (ruptura da membrana plasmática que leva à destruição da célula) [109–111].

O processo consistiu numa série de etapas [105,106]:

1. removeu-se o meio como descrito anteriormente;
2. adicionaram-se 5-6 ml de *TrypLETM* ao frasco;
3. a dispersão ocorreu em 3 a 5 minutos, tempo otimizado em experiências anteriores [112];
4. após esse tempo observaram-se as células ao MOCF, e verificou-se se a maioria das células se encontra em suspensão;
5. uma vez que a camada de células MCF-7 está separada, neutralizou-se o *TrypLETM* adicionando 2-3 ml de meio, já que o meio contém soro fetal bovino e, como o soro possui alfa1-anti-tripsina, ele neutraliza a ação do agente enzimático;
6. suspenderam-se as células por pipetagem suave, sendo a suspensão celular transferida para *falcons* de 15 ml, estéreis e identificados, utilizando um pipetador acoplado a pipetas de *Pasteur* estéreis.
7. Centrifugaram-se os *falcons* a 1 100 rpm, durante 5 minutos e a 4°C para sedimentar as células;
8. descartou-se o sobrenadante do *falcon*;
9. ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de meio completo;
10. foram colocadas num novo frasco contendo aproximadamente 15 ml de meio, identificou-se e pulverizou-se com álcool para colocar na incubadora e continuar a proliferação.
11. No caso de estudos de avaliação da proliferação celular na presença de compostos, procedeu-se à preparação do volume com a concentração adequada de células que se semearam em placas *multiwells* estéreis de fundo plano.

• Contagem e sementeira das células

A cada novo ensaio foi necessário fazer a contagem do número de células, de modo a determinar a concentração de células por unidade de volume. Tal permitiu saber o volume a ser colocado em cada poço, de acordo com o número de células definido para cada experiência, ou até mesmo para fazer a criopreservação das células. Assim, primeiro aplicou-se o protocolo da dissociação das células descrito anteriormente. Após descolar as células, o *pellet* obtido foi ressuspendido em 1 ml de meio completo. Dessa suspensão retiraram-se 10

μl que foram colocados num tubo *ependorf* estéril de 2 ml (*DeltaLab S.L.*, 4092.7N, Espanha) e, já fora da câmara de fluxo laminar, adicionaram-se 10 μl de azul tripano (*Sigma-Aldrich*[®], T0776, EUA) e homogeneizou-se a suspensão. O azul tripano é um corante vital que não é incorporado pela membrana das células viáveis, apresentando as células mortas uma coloração azul ao microscópio (MOCF). Da suspensão retiraram-se 10 μl que foram colocados numa câmara de *Neubauer* (*Neubauer improve*, 0640030, Alemanha) sob uma lamela de vidro (RS, *Cover Glass 100 PCS Thickness 0,13-0,17 mm*, França). É possível fazer a contagem das células utilizando um microscópio de contraste de fase (MOCF). A contagem foi feita com ampliação de 40 \times . A câmara de *Neubauer* tem quatro quadrantes, considerando que o volume de cada quadrante é de 1×10^{-4} ml, então o número de células em 1 ml é dado por: $N = C \times 10^4$ células/ml (Figura 5). No caso de se fazer uma diluição tem de se multiplicar pelo fator de diluição: $N = C \times D \times 10^4$ células/ml [113].

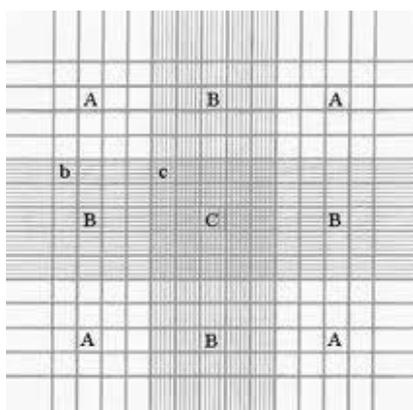


Figura 5 - Câmara de Neubauer (adaptado do [113]).

Utilizando este método de contagem foi possível determinar o número de células viáveis presentes; o passo seguinte dependia da finalidade: criopreservação, estudos *in vitro* ou estudos *in vivo*.

Para a criopreservação das células, à suspensão celular em meio DMEM completo adicionou-se DMSO estéril a 10%, um agente criopreservante que retarda a formação de cristais da água presente no interior das células, facilitando a sua sobrevivência. A suspensão foi colocada em criotubos de 1,5 ml (*SARSTED*, 72380992, Alemanha), devidamente identificados e, em seguida, armazenados na arca a -80°C caso se pretendessem utilizar num curto período de tempo ou seriam transferidos para a câmara de azoto líquido a -190°C .

3.3 Chá verde e extratos de chá verde utilizados

- Preparação do chá verde da marca *Lipton*

A preparação do chá começou por colocar 200 ml de água corrente num *goblet* com um ímã de 1 cm, proporcionando uma homogeneização da solução, sobre uma placa quente magnética (*Jenway, hotplate and stirrer 1000*, RU). Controlou-se a temperatura com um termómetro de laboratório, quando a água atingiu a temperatura de 90°C adicionou-se a saqueta (1, 2 ou 3 saquetas, conforme o pretendido) e manteve-se a temperatura entre os 90 – 95°C por 5 minutos com agitação sem deixar ferver. Em seguida retirou-se o ímã e deixou-se o chá a arrefecer à temperatura ambiente, num local escuro para não haver alteração da composição do chá devido à fotossensibilidade das catequinas. Após 2 horas, a saqueta foi comprimida contra a parede do *goblet* recuperando o máximo de solução possível. O chá foi armazenado num copo fechado e protegido da luz a 4°C.

Com o objetivo de realizar estudos *in vitro* utilizando o chá verde *Lipton*, os chás (previamente preparados usando uma, duas ou três saquetas) foram filtrados em ambiente estéril com um filtro apropriado de 0,20 µm (*GE Healthcare, Whatman®*, filtro 0,20 µm, Alemanha) e armazenados como soluções *stock* em *falcons* de 15 ml protegidos da luz a -20°C.

O número de saquetas por preparação foi selecionado com base na análise por HPLC para determinar exatamente as concentrações de EGCG.

Para os estudos *in vivo* seguiu-se o protocolo de preparação do chá como especificado acima (utilizando uma, duas ou três saquetas) e armazenando o chá em frascos protegidos da luz a 4°C até serem transferidos para os biberões dos animais.

- Soluções de extrato de chá verde

Para este estudo foram utilizados extratos de diferentes fabricantes, GTEE (*ProHealth, Green Tea EGCG Extreme™*, 100 veggie capsules, 390 mg, RU), MGTE (*MyProtein®, Mega Green Tea Extract™*, 90 capsules, 450 mg, RU), e GTE em pó (*MyProtein®, Green Tea Extract powder 500 g*, RU). Foi igualmente realizada previamente a análise de HPLC para determinar as concentrações de EGCG em cada um dos extratos. Os dados dos fabricantes indicam que o GTEE possui 390 mg de EGCG/cápsula, o MGTE teria 180 mg de EGCG/cápsula e o GTE

pó cerca de 10% de EGCG. Tal como para o chá verde para os extratos também se prepararam soluções *stock* para posterior utilização nos estudos *in vitro*.

Para preparação das soluções *stock* utilizou-se tampão fosfato-salino estéril (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), sendo armazenadas em *falcons* de 15 e 50 ml a -20°C protegidos da luz. A partir dessas soluções *stock*, filtradas em ambiente estéril com filtros de 0,20 µm, foram preparadas, por diluição com PBS, as concentrações pretendidas para realização das experiências.

Nos estudos *in vivo* utilizou-se uma solução de GTE em pó com uma concentração de 1,625 g/l, que em teoria equivale a 5 vezes a concentração plasmática de 0,1 µg/ml em humanos. Num *Erlenmeyer* contendo um litro de água corrente (com pH pouco ácido) adicionou-se o pó, pesado numa balança analítica eletrónica (*Radlag*, AS 220/c/2, Alemanha) e homogeneizou-se a solução até que o pó se dissolveu completamente. A solução era guardada no escuro em local fresco.

3.4 Análise HPLC

Para utilização dos extratos e do chá verde neste estudo foi necessária uma determinação prévia das concentrações de EGCG presentes em cada uma das formulações para que posteriormente fossem preparadas as concentrações desejadas para realização dos ensaios. Utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) [114]. Este é um método analítico que se baseia no mecanismo de interação entre as moléculas presentes numa amostra entre duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel, permitindo a separação, identificação e quantificação de substâncias químicas presentes na amostra [114].

Injetou-se a amostra através de uma microseringa na válvula de injeção quando esta estava em posição de carga. Seguidamente rodou-se o manípulo da válvula para a posição de injeção permitindo a entrada do eluente (solvente que constitui a fase móvel) no interior da válvula arrastando consigo a amostra para a coluna. A coluna é um cilindro rígido no qual está depositado um material de enchimento formado por pequenas partículas, nomeadamente sílica, que constitui a fase estacionária. O bombeamento constante do eluente para a coluna, arrasta os solutos que compõem a amostra primeiro para o topo da coluna e depois ao longo da coluna [114].

Quando os solutos apresentam alguma afinidade pela fase estacionária, estabelecem-se por toda a extensão da coluna sucessivos equilíbrios de distribuição dos solutos entre a fase móvel e a estacionária. A separação é possível devido a diferenças na velocidade de migração, resultantes das diferentes constantes de distribuição dos solutos, fazendo com que saiam da coluna separados uns dos outros. Após a saída da coluna os componentes da amostra passaram por um detetor que permitiu medir a absorvância da solução que nele passou. Ligado ao detetor existe um registrador ou sistema de aquisição de dados que permite a obtenção automática do sinal registado no detetor. O sinal é proporcional à concentração do soluto presente na solução que passa no mesmo instante pelo detetor. Com estes dados fez-se a representação gráfica do sinal produzido no detetor em função do tempo que se designa cromatograma da amostra [114].

A análise por HPLC foi efetuada com um equipamento *Gilson* equipado com um *photodiode-array detector* (PDA). Para este estudo usou-se uma coluna *Spherisorb S5 37 ODS-2* (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm) (*Waters Corporation*, EUA) e um cartucho *Nucleosil guard C18* (30 × 4 mm i.d., 5 µm) (*Macherey-Nagel*, EUA) a 24°C. A fase móvel foi constituída por ácido fórmico aquoso a 5% (A) (Formic acid 98-100% for analysis EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur, 1002640100, *Sigma-Aldrich*, EUA) e metanol (B) (Methanol MS SupraSolv®. CAS 67-56-1, *Sigma-Aldrich*, EUA) (v/v), com um gradiente descontínuo 5-15% B (0-10 min), 15-25% B (10-15 min), 25-50% B (15-40 min), 50-80% B (40-50 min), seguido de uma eluição isocrática durante 10 min, com um fluxo de 1 ml/min. Foram adquiridos perfis cromatográficos entre 200-600 nm de comprimento de onda e gravados aos 280 e 320 nm. O tratamento dos dados foi efetuado com o *software Unipoint*® 2.10 (*Gilson*, EUA).

3.5 Estudos *in vitro*

Para as experiências *in vitro*, as células foram semeadas em placas de 48 poços. Foram efetuados ensaios preliminares para verificar qual o melhor número de células/poço. Foram usadas $7,2 \times 10^4$ células/poço (12 poços) e $7,2 \times 10^4$ células/poço (12 poços), cultivadas por 72 h (tempo de adesão das células MCF-7 nos ensaios efetuados). Uma vez que não houve diferenças significativas ($p = 0,697$) entre os dois lotes de experiências passaram a semear-se $7,2 \times 10^3$ células/poço, sendo cultivadas durante 72 h antes de se adicionarem quaisquer compostos/soluções à cultura celular.

A distribuição nas placas em estudo foi desenhada de modo a conter um conjunto de controlo de seis amostras e seis repetições por concentração de cada composto/solução a adicionar. Posteriormente as células foram incubadas com soluções de GTEs e chá verde *Lipton* com diferentes concentrações de EGCG (0,5; 1; 5; 10 µg/ml). Quer as soluções de EGCG, quer o chá verde foram adicionados diariamente durante o período experimental, constituindo um modelo de aplicação crónica.

- Estudo da viabilidade celular após aplicação crónica de soluções enriquecidas em EGCG

Os efeitos da aplicação de doses diárias foram avaliados após 48, 72, 96, 144 e 192 h de incubação com GTEs, ou seja, após 2, 3, 4, 6 e 8 aplicações, respetivamente. Para as concentrações 0,5; 1; 5 e 10 µg/ml foram feitas seis amostras de cada uma e um conjunto de seis amostras de controlo. Para GTE pó e chá verde *Lipton* foram estudadas as concentrações 0,5 e 5 µg/ml depois de 6 aplicações, isto é, até às 144 h.

- Estudo da viabilidade celular após aplicação aguda de soluções enriquecidas em EGCG

Foi estudada a eficácia da aplicação repetida de doses, quando se trocou diariamente o meio de cultura, ao fim de 48, 96 e 144 h de incubação com GTEs nas diferentes concentrações: 0,5; 1; 5 e 10 µg/ml. Para cada concentração foram feitas igualmente seis amostras e um conjunto de seis amostras de controlo.

- Estudo da viabilidade após tratamento com fármacos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) e Agência Europeia do Medicamento (EMA) ou regime de fármacos para o cancro da mama.

Foram estudados alguns dos fármacos aprovados pela FDA e EMA ou regime terapêutico para o cancro da mama: 5-fluorouracilo (5-FU) (*Sigma*, F6627, EUA) com uma administração de 500 mg/m² [72], Capecitabina (CAP) (*Actavis*, *Capecitabina Actavis* 150 mg, EUA) com uma administração de 1 000 mg/m² [73], Docetaxel (DOT) (*Actavis*, *Docetaxel Actavis* 20 mg/ml, EUA) com uma administração de 60 mg/m² [69], Doxorubicina (DOX) (*Sigma*, 44583, EUA) com uma administração de 60 mg/m² [70], Epirubicina (EPI) (Epirubicina Teva 2 mg/ml, Israel) com uma administração de 100 mg/m² [71] e Paclitaxel

(PAX) (*Actavis, Paclitaxel Activis* 6 mg/ml, EUA) com uma administração de 175 mg/m² [68]. As concentrações testadas foram as indicadas para terapia humana, adaptadas à área do poço. Os fármacos utilizados foram cedidos pelo Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC), através do protocolo existente com o Instituto de Biofísica da FMUC.

- Estudo para avaliar de que forma a administração de soluções enriquecidas com EGCG afeta a citotoxicidade dos fármacos aprovados pela FDA e EMA ou regime de fármacos para cancro da mama

Os fármacos referidos anteriormente foram administrados segundo o protocolo mencionado acima e foram conjugados com diferentes concentrações de GTE pó (0,5 e 5 µg/ml). Após aplicação destas doses a cada 24 h, a viabilidade celular foi testada ao fim de 144 h (Figura 6).

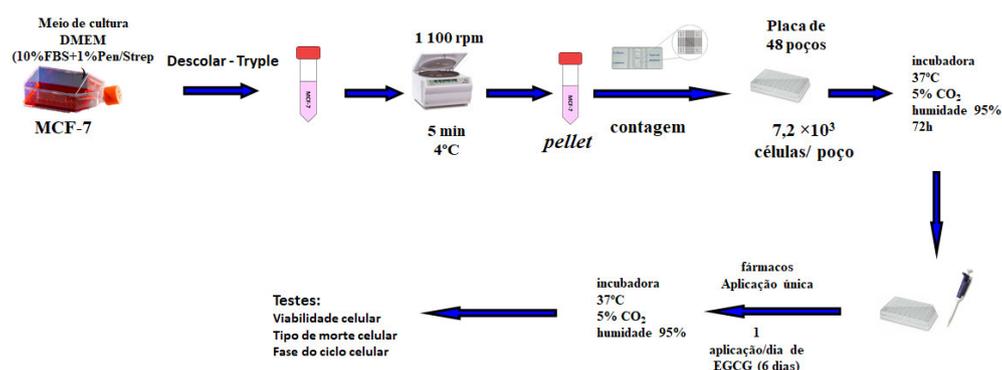


Figura 6 – Esquema resumido do protocolo seguido para a realização das experiências *in vitro*.

3.6 Ensaio de MTT – Teste de viabilidade celular

O ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na avaliação do dano induzido pelo composto/extrato em estudo sobre a atividade glicolítica das células, através da análise da atividade das desidrogenases mitocondriais. As desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando o composto de coloração amarela hidrossolúvel num composto azul-escuro/roxo: os cristais de *formazan* {E,-Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan} insolúveis em solução aquosa. A nível celular o MTT é acumulado no

interior da célula por endocitose e, após a sua redução, os cristais de *formazan* resultantes são armazenados em vesículas dos endossomas e/ ou lisossomas, que posteriormente os transportam para fora da célula por exocitose. Assim sendo, a produção de *formazan* reflete o estado funcional da cadeia respiratória e, conseqüentemente, a viabilidade celular [115].

Nos ensaios de MTT aplicados nos estudos *in vitro*, o meio de cultura de cada poço foi totalmente retirado, contendo ou não os agentes testados, e, em seguida, considerando o volume/poço, adicionou-se uma mistura de meio DMEM completo com MTT a 10%. A caixa de cultura foi colocada novamente na incubadora nas mesmas condições durante 4 horas. Após esta incubação, removeu-se todo o conteúdo líquido dos poços e os cristais de *formazan* foram dissolvidos com uma solução de HCl 37% 0,04 N (VWR, 20255.420, EC) em isopropanol (Honeywell /Riedel-de Haen®, 33539, Alemanha), com volume igual ao da mistura meio + MTT. Passados 15 minutos a absorvância da solução, bem homogeneizada, foi lida com um espectrofotômetro (BioTek®, Synergy HT, EUA) acoplado a um computador através da interface Gen5™ BioTek® (Fisher Scientific, Ontário, Canada). A leitura da absorvância das placas nos comprimentos de onda 570 e 620 nm permitiu quantificar os cristais de *formazan*, valor diretamente proporcional ao número de células viáveis (Figura 7) [115].

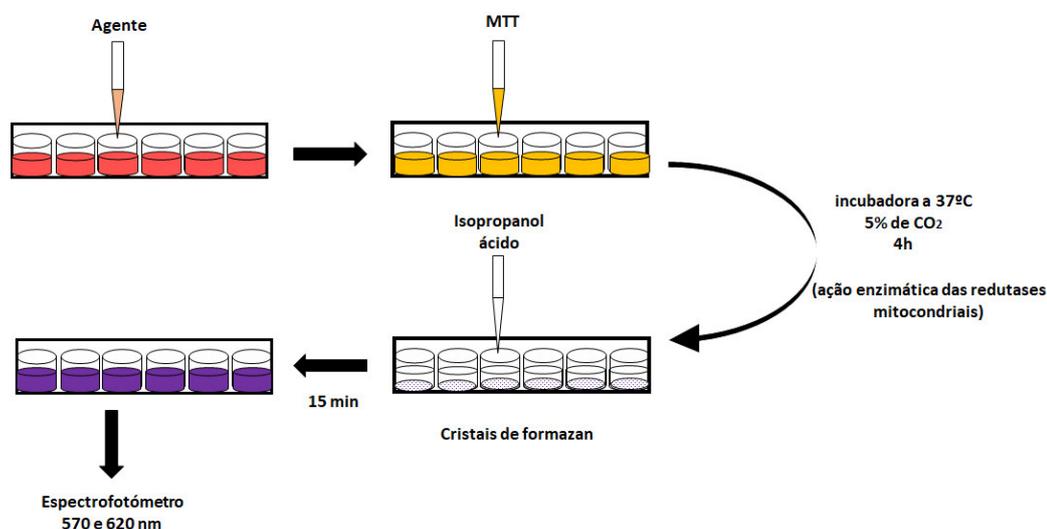


Figura 7 – Esquema ilustrativo do teste de viabilidade celular com MTT, em que a atividade glicolítica das células, após serem incubadas com os compostos em estudo, é avaliada através da ação das desidrogenases mitocondriais. Estas transformam o MTT, de coloração amarela, em cristais de coloração roxa. A produção desses cristais reflete o estado funcional da cadeia respiratória e, conseqüentemente, a viabilidade celular.

3.7 Citometria de fluxo – Medição de parâmetros físico-químicos celulares

A citometria de fluxo é uma ferramenta muito eficaz na análise detalhada de populações celulares complexas num curto período de tempo. Permite analisar várias características físicas e/ou químicas de uma única célula à medida que esta flui em suspensão através de um dispositivo de deteção ótico-eletrónica. A eficiência do seu funcionamento depende das características de dispersão da luz das células alvo, consoante os corantes ou anticorpos monoclonais utilizados, tendo em vista moléculas localizadas na superfície da célula ou moléculas intracelulares [116].

Basicamente a suspensão de células é injetada no equipamento como um fluxo de células que está envolto numa corrente de fluído e que é percorrido por um feixe *laser*. A luz emitida pelo *laser* pode ser absorvida ou desviada pelas células. Uma vez absorvida esta é novamente emitida sob a forma de fluorescência, caso a célula tenha substâncias fluorescentes ou anticorpos marcados com fluorocromos na superfície ou no interior. Já a dispersão da luz depende da estrutura interna da célula, do seu tamanho e forma. A luz dispersa e a luz fluorescente são detetadas por vários fotodíodos e, em seguida, amplificadas. O sistema dispõe ainda de filtros óticos que garantem que somente a luz com o comprimento de onda desejado atinge o fotodetector [116].

Esta técnica permite uma rápida análise do DNA, da expressão fenotípica e função celular. É fundamentalmente utilizada para determinação do tipo de morte celular e do ciclo celular através da medição do conteúdo do DNA de cada célula [116].

A citometria de fluxo fornece dados sobre o tipo de morte celular, que pode ser determinada utilizando a anexina V associada ao iodeto de propídio. A anexina V é usada para reconhecer a fosfatidilserina translocada e o iodeto de propídio funciona como corante de exclusão de viabilidade celular, permitindo detetar células apoptóticas e discriminar entre apoptose precoce e tardia, e necrose [116].

Um dos sinais mais precoces de apoptose é a translocação de fosfolípidos da membrana celular, como por exemplo a fosfatidilserina, da camada interna desta membrana celular para a camada externa. Quando exposta ao ambiente extracelular, ela fica disponível para se ligar à anexina V, que apresenta dependência de ião cálcio (Ca^{2+}). Contudo, a translocação da fosfatidilserina também ocorre em situações de necrose, logo a anexina V não é um marcador

absoluto da apoptose. Neste contexto, usa-se em associação a corantes essenciais como o iodeto de propídio, um corante vermelho que penetra nas células quando a integridade da membrana plasmática está afetada. Esta situação ocorre apenas nos estádios finais da apoptose ou em casos de necrose celular. Portanto, a avaliação desses dois marcadores permite-nos identificar o tipo de morte celular induzido pela terapia instituída [116].

A distribuição do DNA numa população de células em crescimento na fase G2/M é o dobro da quantidade de DNA apresentado na fase G1/G0, mostrando variações da quantidade do DNA na fase S. A fase G1 é marcada por uma intensa síntese de enzimas, de RNA e “armazenamento” de proteínas e, conseqüentemente, ocorre o crescimento celular; na fase S ocorre a duplicação do material genético; na fase G2 ocorre numa intensa síntese de proteínas e rápido crescimento celular preparando a célula para a mitose; na fase M ocorre a separação dos cromossomas da célula-mãe [116].

A monitorização do ciclo celular, bem como a sua regulação é muito importante para compreender os efeitos do tratamento nas células do cancro da mama.

3.8 Estudos *in vivo*

A experimentação animal é regida pelo princípio dos 3R's do inglês: *Reduction*, *Replacement* e *Refinement*. Traduzindo para português será, então, redução, substituição e refinamento. O princípio dos 3R's salvaguarda que só se inicia um procedimento *in vivo* quando o ensaio tenha apresentado resultados *in vitro* que garantam a utilização do menor número de animais, que se recorra a outros procedimentos se possível e que seja causado ao animal o menor desconforto possível, assegurando o seu bem-estar durante todo o estudo e occisando-o em casos limite [117].

Assim, só após a realização de estudos *in vitro*, com base em conhecimentos adquiridos previamente que asseguram a reprodutibilidade *in vivo*, se iniciaram estes ensaios.

Neste projeto foram utilizadas duas espécies animais: Balb/C *nude* (ratinhos) e RNU (ratos *nude*). Foram selecionadas, fêmeas com aproximadamente 1,5 mês de idade, fornecidas e alojadas nas instalações para animais *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research* (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC). Estas instalações estão devidamente equipadas de acordo com a legislação de bem-estar animal (24-26°C, humidade relativa do ar mantida a 40-60%, ciclos de luz controlados

e um mínimo de ruído). Os alimentos, água, GTEs e chá foram disponibilizados *ad libitum*. Os animais foram occisados utilizando um elevado teor de isoflurano com equipamento adequado (IMS Anesthesia equipment line, Harvard Apparatus, UK). Todos os procedimentos foram efetuados com vista a minimizar o sofrimento dos animais. Todos os protocolos foram desenvolvidos de acordo com o Decreto-lei nº 113/2013, de 7 de Agosto (legislação nacional que transpõe a Diretiva Europeia 63/2010/CE) e com a devida autorização pela Direção Geral de Veterinária e de acordo com o Orgão de Bem-Estar Animal do IBILI (ORBEA 17/2015) (Anexos I e II).

- Modelo animal para estudo do cancro da mama

Um dos modelos mais simples e mais comumente utilizados nesta área baseia-se na inoculação de linhas celulares humanas em animais imunocomprometidos [118]. O facto de algumas linhas celulares do cancro da mama humano originarem tumores em ratinhos imunodeficientes foi relatado pela primeira vez em 1962 por Isaacson e Cattanach. No entanto, a técnica só passou a ser amplamente utilizada após a sua inoculação de ratinhos mutantes *nudes* (sem pêlo) [119].

Os modelos animais de pesquisa mais utilizados em experiências de xenoenxertos são os ratinhos *nude* (Foxn1) e ratinhos de imunodeficiência combinada severa (SCID do inglês *severe combined immunodeficiency*), que possuem mutações que afetam o seu sistema imunológico. Os ratinhos *nude* (Foxn1) apresentam uma mutação natural recessiva autossômica no cromossoma 11 que causa falha no crescimento do pêlo e outras alterações, como distúrbios na formação do timo, por conseguinte são deficientes em células T. Os ratinhos SCID têm uma mutação espontânea que resulta na inativação da proteína cinase do DNA que leva à depleção de células T e B funcionais. Além destes, foram também desenvolvidos animais imunodeficientes a partir de outras espécies, como por exemplo os ratos atímicos RNU (*Rowett Nude Rats*), uma mutação do *Rattus norvegicus* [119].

Os modelos animais utilizados para o estudo da linha celular de cancro da mama e para administração do EGCG foram os modelos de xenoenxerto com injeção subcutânea das células tumorais humanas num modelo de desenvolvimento não-ortotópico em fêmeas das espécies: Balb/C *nude* e RNU (rato *nude*).

- Protocolo do estudo *in vivo*

Após proliferação, dissociação celular e contagem das células segundo as condições mencionadas anteriormente (seção 3.2), procedeu-se à preparação de seringas com aproximadamente com 0,2 ml de suspensão celular contendo $2,8 \times 10^6$ células para inoculação em ratinhos fêmea Balb/C *nude* e de aproximadamente 0,8 ml de suspensão celular contendo $20 - 24 \times 10^6$ células para inoculação em ratos fêmea RNU. O número de células a ser injetado foi determinado com base na literatura e prática da equipa.

Para as injeções usaram-se seringas de 1 ml (*T Terumo*[®] *Syringe*, U-100 insulina, SS+01H1, Bélgica) e agulhas de 25G (*BD Microlance*[™], 25G ^{5/8}" , 0,5×16 mm, 300 600, Espanha).

Em ambiente devidamente controlado procedeu-se à colocação do animal numa câmara de fluxo laminar para manipulação animal, limpa e desinfetada, em ambiente calmo e controlado. Para injeção subcutânea, o animal foi posicionado em decúbito lateral e injetou-se a suspensão celular na coxa direita. Em seguida, identificou-se o animal para posteriores manipulações e recolocou-se na sua gaiola.

Pelo facto das células MCF-7 possuírem recetores de estrogénio uma vez que esta hormona estimula o seu crescimento e multiplicação, uma semana após a injeção subcutânea das células MCF-7 foi preparada uma emulsão de β -estradiol-3-benzoato (*Sigma*, E8750, EUA) em óleo de sésamo (*Sigma*, S3547, EUA), com uma concentração de 0,5 mg/ml, homogeneizada por vortexação. O óleo foi previamente filtrado (*Millipore* 0,20 μ m) em condições de esterilidade. Foram retirados 0,1 e 0,5 ml da emulsão, respetivamente, para os Balb/C *nude* e RNU. A emulsão foi injetada subcutaneamente na região dorsal dos ratinhos e ratos fêmea (Figura 8).

Os pesos dos animais foram registados semanalmente, antes e durante o protocolo experimental, utilizando uma balança própria para animais (*Seca*, modelo 734, serie 1/1, Alemanha). O desenvolvimento e as dimensões dos tumores foram monitorizados semanalmente e feito o registo.

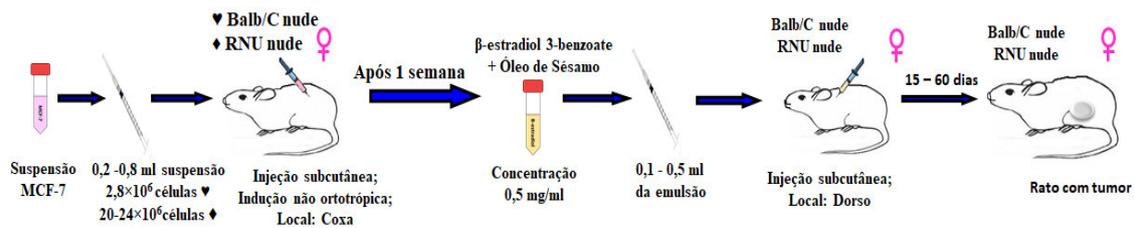


Figura 8 – Esquema que resume o procedimento de injeção de células do cancro da mama em ratos e ratinhos fêmea.

3.9 Estudos imagiológicos – tomografia por emissão de positrões (PET)

A tomografia por emissão de positrões, também conhecida pela sigla inglesa PET (do inglês, *Positron Emission Tomography*), é um exame imagiológico que permite obter informações acerca do estado funcional dos órgãos, pela deteção do positrão emitido pelo radionuclídeo utilizado.

A imagem formada é dada pela localização da emissão dos positrões pelos radionuclídeos absorvidos pelos órgãos do doente. No entanto, como o positrão é uma partícula antimatéria do eletrão, ele não chega a percorrer uma distância significativa até entrar em contacto com um eletrão e aniquila-se originando de um par de raios gama com direções opostas. Desta forma é impossível detetar os positrões diretamente com o equipamento, daí que este seja em forma de tubo oco, isto é, formando uma coroa de detetores de raios gama (câmara gama) dispostos em circunferência à volta do doente. Com a ajuda de *software* adequado baseado em algoritmos, consegue reconstruir-se uma imagem dos locais de emissão de positrões, a partir das energias e direções de cada par de raios gama com a ajuda de um computador, gerando imagens tridimensionais. O equipamento utilizado neste projeto foi desenvolvido pela equipa em parceria com a Universidade de Aveiro (CENTRO-01-0247-FEDER-017823, SII&DT 17823 EASYPET; PTDC/BBB-IMG/4909/2014).

O radionuclídeo utilizado neste trabalho foi a fluorodesoxiglicose (FDG) marcada com Fluor-18 (¹⁸F) (ICNAS, *IBA Cyclone*[®], Portugal), um análogo da glicose, que permite estudar o metabolismo dos órgãos e tecidos. As estruturas com metabolismo mais intenso (como por exemplo o tumor) concentram mais ¹⁸F –FDG, assim como os seus órgãos de excreção predominante. O ¹⁸F tem um tempo de meia vida de cerca de 2 horas (109,7 min).

Para a aquisição das imagens os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (Ketamina *Hikma* 50 mg/ml, *Hikma* Farmacêutica™, Portugal) e clorpromazina (*Largactil*®, 5 mg/ml, Laboratórios Vitória, Portugal) numa proporção de 1:3. A ketamina é um medicamento utilizado principalmente para induzir e manter a anestesia, funcionando como inibidor do glutamato sobre os recetores NMDA, que são os principais recetores responsáveis por mediar a resposta excitatória do sistema nervoso central. Já a clorpromazina atua como tranquilizante sem causar sedação, uma vez que bloqueia os impulsos gerados pela dopamina nas sinapses [120,121].

Nos ratinhos administraram-se 0,1 - 0,3 ml da mistura anestésica diluída em soro fisiológico em partes iguais (1:1), via intraperitoneal (i.p.). Após a indução da anestesia os animais foram mantidos à temperatura de 37 – 39°C acoplado uma bomba de aquecimento de água (*Adroit Medical Systems, HTP*®-1500, EUA) à plataforma do equipamento (*easyPET, RI-TE*, Portugal), o que permite a manutenção da temperatura do animal enquanto anestesiado. Não esquecer que a própria anestesia diminui a temperatura corporal e que estes animais são *nude*, já de si muito frágeis, e com tumor.

O ¹⁸F-FDG é administrado ao animal via i.p., para que seja internalizado pela célula através do mesmo transportador da glicose, porém dentro da célula ele não é metabolizado mas sim convertido numa forma que é conservada no seu interior. Por conseguinte, pode ser utilizado para detetar células com alto consumo de glicose e que, conseqüentemente, contêm grande quantidade de transportadores membranares, como acontece nas células tumorais em crescimento rápido (caso em estudo), permitindo a visualização da massa tumoral de cancro da mama induzido na coxa direita dos animais.

A dose de ¹⁸F-FDG a injetar foi medida utilizando um calibrador de dose (*CRC*®-15 W, *Capintec*, EUA) em seringa de 1 ml (*T Terumo*® Syringe, U-100 insulina, SS+01H1, Bélgica) acoplada a agulha 25G (*BD Microlance*™, 25G, 5 x 8 ‘; 0,5 x 16 mm, 300600, Irlanda), de acordo com as normas de segurança para manipulação de substâncias radioativas (*Protector Shield Biodex*, EUA).

3.10 Estudos histológicos

A técnica histológica consiste num conjunto de etapas com o objetivo de preparar um determinado tecido para ser analisado microscopicamente, seja para fins de pesquisa científica ou diagnóstico patológico [122,123]. Entre os procedimentos encontra-se a colheita de material, fixação, processamento para técnica de rotina, microtomia e coloração. No caso dos tecidos calcificados, após a fixação é necessário fazer a descalcificação do tecido [122,123].

As amostras colhidas foram colocadas em *cassetes* (*PrintMate™ Embedding Cassettes*, A84810048, EUA) e, logo de seguida, iniciou-se o procedimento evitando a degradação do tecido pela ação das enzimas presentes nas células. O primeiro passo foi a fixação: as *cassetes* foram colocadas dentro de um recipiente com o agente fixador, formol neutro tamponado a 10% (*AppliChem Panreac*, 1430091.1214, Espanha), que penetra no tecido substituindo toda a água tecidual, preservando assim a amostra [122,123].

Após a fixação, a amostra foi processada, com o objetivo de incluir o tecido num meio sólido e firme o suficiente para permitir a obtenção de cortes finos (3 a 5 µm de espessura) que possam ser corados e visualizados ao microscópio ótico. O processamento é composto por várias etapas. Primeiro fez-se a desidratação do tecido em usando e soluções de etanol (Álcool etílico absoluto, AGA, Portugal) de concentração crescente que foram substituindo a água e o fixador no tecido. Após essa etapa, foi feita a diafanização do tecido, que clarifica o material, tornando-o translúcido ao remover o etanol e substituí-lo por um fluido miscível com o meio de impregnação, o mais comumente utilizado é o xilol (*Xylool*, 1330-20-7, Merck, Alemanha). No processo de impregnação o agente diafanizador foi substituído pelo meio de impregnação. Nessa etapa, as peças foram infiltradas por uma substância de consistência firme para que adquirissem rigidez suficiente - *paraplast* líquido (*Paraplast*, Sigma-Aldrich, P3683, EUA). No final da impregnação obteve-se um bloco de *paraplast*, contendo a amostra no seu interior usando para tal um equipamento dedicado (*Medite*, Tes 99, Alemanha) e recipientes retangulares de inox acopláveis às *cassetes* (*Thermo Fisher Scientific*, *Mini Metal Base Mold*, Leica Biosystems, EUA). Os blocos foram cortados com um micrótomo (Leica, RM2155, Alemanha) [122,123].

Seções (cortes) extremamente finas foram obtidas usando facas descartáveis especiais (*Leica*, *high profile microtome disposable blades*, Alemanha). Os blocos foram desbastados e estando à profundidade correta, os cortes histológicos foram obtidos sob a forma de uma

“ténia” de cortes sequenciais. Os cortes seriados selecionados foram estendidos numa solução alcoólica a 30% e depois apanhados com uma lâmina de vidro (*Knittel Glaser, Superfrost®*, *microscope slides* K067 76×26mm, Alemanha) e transferidos para um banho termostatizado de fundo escuro (para fazer contraste com o branco do *paraplast*) a 37°C contendo água destilada/corrente (*Tissue water bath* 6951, Alemanha). Estes cortes ficaram sem a maior parte das rugas e foram transferidos para lâminas de vidro, previamente revestidas com uma camada fina de cola biológica (*Sigma-Aldrich*, P8920, EUA), identificadas e secas (pelo menos 24 h) em *racks* (*Medite*, 0T540.340, Alemanha). De seguida, voltaram novamente à estufa (*Raypa, Drying oven* 40°C, Espanha), durante pelo menos 24 horas, para garantir que os cortes ficassem perfeitamente aderentes às lâminas de vidro e não se descolassem durante o processo de coloração [122,123].

A coloração dos cortes possibilita evidenciar os componentes do tecido ou fazer a distinção entre diferentes estruturas do tecido. A coloração utilizada foi a hematoxilina-eosina, que consiste numa técnica simples que permite a diferenciação de um grande número de estruturas do tecido. A hematoxilina cora os núcleos de roxo/azulado e a eosina cora os citoplasmas e fibras do tecido conjuntivo de rosa. Como os corantes são aquosos efetuou-se a desparafinização e hidratação dos cortes para que estes pudessem ser corados [122,123].

Os cortes tiveram de ser desparafinizados e hidratados, numa sequência de tinas com xilol (2×), etanol absoluto (2×), etanol 95% (2×), etanol 70% (1×), água corrente (1×). As lâminas com os cortes foram colocadas numa tina com hematoxilina a 2% (*Sigma Aldrich*, MHS1, EUA) (15 min), passaram para uma tina com água corrente (5-10 min) e depois para uma tina com eosina alcoólica 1% (*Sigma-Aldrich*, HT110280, EUA) (5 min). Depois de coradas as lâminas voltaram a ser desidratadas e repetiu-se o procedimento até ao agente diafanizador, sendo a sequência de tinas a inversa da já referida. De modo a proteger os cortes, as lâminas foram cobertas com uma lamela (*RS, Cover Glass 100 PCS Thickness* 0,13-0,17 mm, França) colada com uma cola sintética (*Fluka*, 44581, Alemanha) que só é miscível com o xilol e tem um índice de refração semelhante ao do vidro. Após secagem, a lâmina ficou pronta para ser analisada utilizando uma lupa ótica (*Nikon, SMZ 1500*, Japão) e um microscópio ótico (*Nikon, Eclipse C600* Japão) [122,123]. A lupa/microscópio estão associados a um sistema computadorizado com *software* adequado, permitindo o registo das imagens obtidas.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a aplicação IBM SPSS® *Statistics*, versão 23 (IBM Corporation, Armonk, EUA), tendo os resultados sido analisados com um nível de significância de 5%.

Uma vez que a viabilidade celular, medida através do MTT, é dependente da experiência, com variações substanciais inter-experiência, neste trabalho foram usados os valores de MTT em percentagem do valor médio do controlo da experiência e não os valores absolutos de MTT.

As comparações dos valores percentuais de viabilidade celular entre os grupos foram realizadas através de testes não paramétricos devido ao tamanho usual das amostras, nomeadamente através do teste de *Mann-Whitney* sempre que houve dois grupos em análise, ou do teste de *Kruskal-Wallis* com comparações múltiplas ajustadas, *a posteriori*, sempre que se justificasse.

A avaliação do efeito do tempo nos valores de MTT (em % do controlo) para as diferentes concentrações das substâncias testadas foi feita através de uma regressão linear.

Dado que era necessário definir o tempo de incubação das células MCF-7 com aplicações diárias de EGCG, foi definido que as células deveriam estar nas caixas de cultura até que a viabilidade celular diminuísse pelo menos 30%, ou seja, foi usada a Análise de sobrevivência de *Kaplan-Meier* para determinar o tempo médio necessário para que se atingisse 70% da viabilidade celular dos controlos da própria experiência.

Os resultados foram apresentados recorrendo essencialmente a gráficos de barras e, diagrama de extremos e quartis, dado o grande volume de informação para disponibilizar em tabelas.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Num estudo anterior realizado pela equipa foi possível determinar as concentrações de EGCG nos diferentes extratos e chás verdes através da técnica de HPLC [112]. Todas as amostras estudadas tiveram como base de referência o perfil cromatográfico de EGCG-Sigma, que contém mais de 95% de EGCG (*Sigma-Aldrich*[®], E4143, EUA), e o espectro de UV a 274,4 nm. A partir desses resultados foi possível selecionar os extratos e chás verdes para se prosseguirem os estudos *in vitro* e *in vivo* com a linha celular MCF-7.

Assim, para o estudo da linha celular do cancro da mama MCF-7 foram utilizados:

- *Green Tea EGCG Extreme* (GTEE);
- *Mega Green Tea Extract* (MGTE);
- *Green Tea Extract powder* (GTE em pó);
- Chá verde *Lipton*.

As concentrações referentes a cada uma das substâncias estão apresentadas nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG presente nos extratos de chá verde em cápsula e em pó.

Amostra	Peso do conteúdo por cápsula (mg)	Peso de EGCG (mg) por cápsula	EGCG (%) por cápsula
GTEE	750	403,14	54
MGTE	1 200	434,47	36
	Peso do conteúdo do saco (mg)	Peso de EGCG (mg) no pó	EGCG (%) no pó
GTE	3 000	203,74	7

Tabela 10- Avaliação quantitativa de EGCG recuperado durante a preparação de uma, duas e três saquetas de chá verde da marca *Lipton*.

Amostra	EGCG (mg) no chá (200 ml)			EGCG (mg) por ml de chá		
	1	2	3	1	2	3
Nº saquetas	1	2	3	1	2	3
<i>Lipton</i>	40,3	91,8	133,6	0,243	0,567	0,856

- Estudos *in vitro*

4.1 Padronização dos valores de MTT

A primeira etapa do estudo foi avaliar, através do teste de MTT, se a viabilidade celular, das amostras controlo das diferentes caixas era homogênea, no sentido de não enviesar as comparações realizadas. Verificou-se, utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, que existe diferença estatisticamente significativa entre os valores MTT dos controlos das várias caixas ($p < 0,001$).

Por outro lado, os valores de MTT dos controlos estão moderadamente correlacionados com o tempo em que foi realizada a experiência ($r = 0,461$; $p < 0,001$) e variam com o tempo (dias) nas experiências em que foram usadas, respetivamente, concentrações de 0,5 µg/ml e 1 µg/ml ($p < 0,001$). Contudo nas experiências feitas com concentrações de 5 µg/ml e 10 µg/ml, os valores de MTT mostraram ser sensivelmente constantes com o passar do tempo ($p = 0,206$).

Neste contexto, os valores de MTT das substâncias foram padronizados aos controlos de cada caixa e optou-se pela padronização em % do valor médio do controlo.

4.2 Determinação do tempo ótimo para avaliação

4.2.1 Avaliação da influência do tempo em cultura nos valores de MTT (% controlo)

Avaliou-se se haveria diferença estatisticamente significativa nos valores de MTT ao longo do tempo (com aplicação diária da dose respetiva) usando o teste de *Kruskal-Wallis*, para cada solução com EGCG e para cada concentração. Constatou-se que a viabilidade

celular se altera significativamente com o passar do tempo quando é aplicado GTEE com concentração de pelo menos 1 µg/ml ou quando é aplicado MGTE com concentração de 10 µg/ml, sendo sempre alterada quando é administrado GTE em pó, qualquer que seja a concentração usada. Na Figura 9 é possível observar essas alterações.

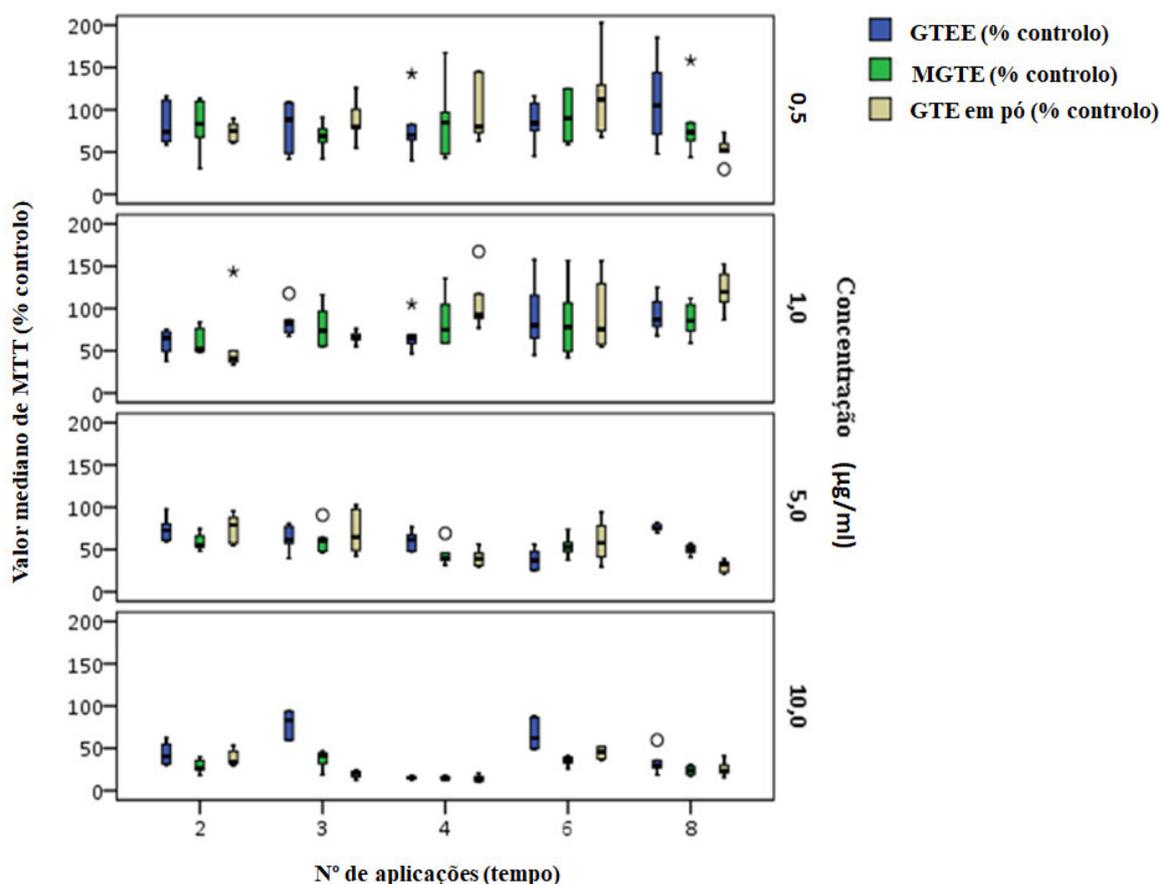


Figura 9 – Gráfico relativo à análise da viabilidade celular da linha MCF-7, para os valores de MTT padronizados por % do valor do controle, após aplicação diária de GTEE, MGTE ou GTE pó com diferentes concentrações de EGCG (0,5; 1; 5 e 10 µg/ml) com 2, 3, 4, 6 e 8 aplicações, ou seja, respetivamente, 3, 4, 5, 7 e 9 dias. A análise estatística utilizando teste de *Kruskal-Wallis* comprovou o efeito citotóxico dos extratos sobre as MCF-7. Nota: *outliers extremos; °outliers moderados.

Constatou-se que existe diferença estatisticamente significativa para os valores medianos de MTT ao longo do tempo, sendo esta acentuada para concentrações mais elevadas de EGCG nestes extratos. Através da análise do gráfico anterior (Figura 9) é possível observar qual o tempo ideal, em dias, isto é, escolher a duração do ensaio para cada extrato, relativamente a cada concentração. Comprovou-se, assim, a eficácia do EGCG proveniente de diferentes extratos no que diz respeito à inibição do crescimento da linha celular MCF-7, ou seja, à citotoxicidade para esta linha tumoral.

4.2.2 Determinação do tempo necessário para que seja mensurável a eficácia relativa dos extratos

Definiu-se eficácia relativa como uma redução de pelo menos 30% na viabilidade celular relativamente ao valor médio dos controlos da própria experiência. Desta forma, identificou-se a duração da experiência (nº de aplicações/dias) necessária para que a sobrevivência celular atingisse os 70% do valor médio do controlo da própria experiência, através da curva de *Kaplan-Meier*. O tempo necessário para o evento definido, em dias, corresponde ao número de aplicações + 1 dia, dado que a viabilidade celular é medida 24 horas após a última aplicação.

A análise de sobrevivência, tendo em conta o evento “% MTT < 70% valor do controlo”, foi independente da concentração usada:

- **GTEE:** o nº de aplicações/tempo médio até atingir 70% do valor do controlo foi de $5,65 \pm 0,23$ aplicações (resultados lidos aos 7 dias), sendo que em metade dos casos se atingiram os 70% do valor do controlo até aos 7 dias;
- **MGTE:** o tempo médio até atingir 70% do valor do controlo foi de $5,36 \pm 0,22$ aplicações (resultados lidos aos 7 dias), ou seja, em metade dos casos atingiram-se os 70% do valor do controlo até aos 7 dias;
- **GTE pó:** o tempo médio até atingir 70% do valor do controlo e de $5,73 \pm 0,23$ aplicações (resultados lidos aos 7 dias), isto é, em metade dos casos atingiram-se os 70% do valor do controlo até aos 7 dias.

Da Tabela 11 consta a análise de sobrevivência para a linha MCF-7 após a incubação com GTEE, MGTE e GTE pó com diferentes concentrações de EGCG.

Tabela 11 – Análise de sobrevivência (número de aplicações necessária para se atingirem 70% do valor médio dos controlos da própria experiência) para a linha MCF-7, após aplicação de GTEE, MGTE e GTE pó com diferentes concentrações de EGCG.

Substância	Concentração EGCG	Média		Mediana	
		Estimativa	Erro Padrão	Estimativa	Erro Padrão
GTEE	0,5	6,362	0,399	6,000	0,603
	1,0	5,775	0,433	6,000	0,628
	5,0	6,381	0,466	8,000	0,605
	10,0	5,268	0,431	6,000	0,665
		Média		Mediana	
		Estimativa	Erro Padrão	Estimativa	Erro Padrão
MGTE	0,5	5,650	0,424	6,000	0,653
	1,0	5,252	0,439	6,000	0,657
	5,0	5,394	0,420	6,000	0,676
	10,0	6,056	0,399	6,000	0,642
		Média		Mediana	
		Estimativa	Erro Padrão	Estimativa	Erro Padrão
GTE pó	0,5	5,250	0,435	6,000	0,661
	1,0	5,766	0,431	6,000	0,632
	5,0	6,055	0,416	6,000	0,620
	10,0	6,500	0,369	6,000	0,615

Com base na Figura 9 e na Tabela 11 pôde concluir-se que o melhor tempo de incubação da linha MCF-7 com qualquer um dos extratos foi de 7 dias, ou seja, 6 aplicações, pelo que os estudos subsequentes a esta etapa foram efetuados nestas condições.

4.3 Modelo de aplicação dos compostos (aplicação crónica *versus* aplicação aguda)

Comparou-se a viabilidade celular, em percentagem do valor médio dos controlos da experiência, entre a administração crónica e a administração aguda, recorrendo ao teste de *Mann-Whitney*. Consideraram-se, portanto, dois tipos de regime de administração das dosagens dos extratos de EGCG. Por administração crónica entende-se a junção de nova dose de EGCG nos dias subsequentes sem mudar o meio de cultura; por administração aguda entende-se a renovação do meio de cultura e administração de outra dose equivalente à anteriormente colocada.

a. Análise global

A nível global a análise comparativa (utilizando o teste de *Mann-Whitney*) apresentou um valor de $p = 0,752$, sendo este valor não significativo, o que indica que não existe diferença estatisticamente significativa entre o modelo crónico e o modelo agudo (Figura 10).

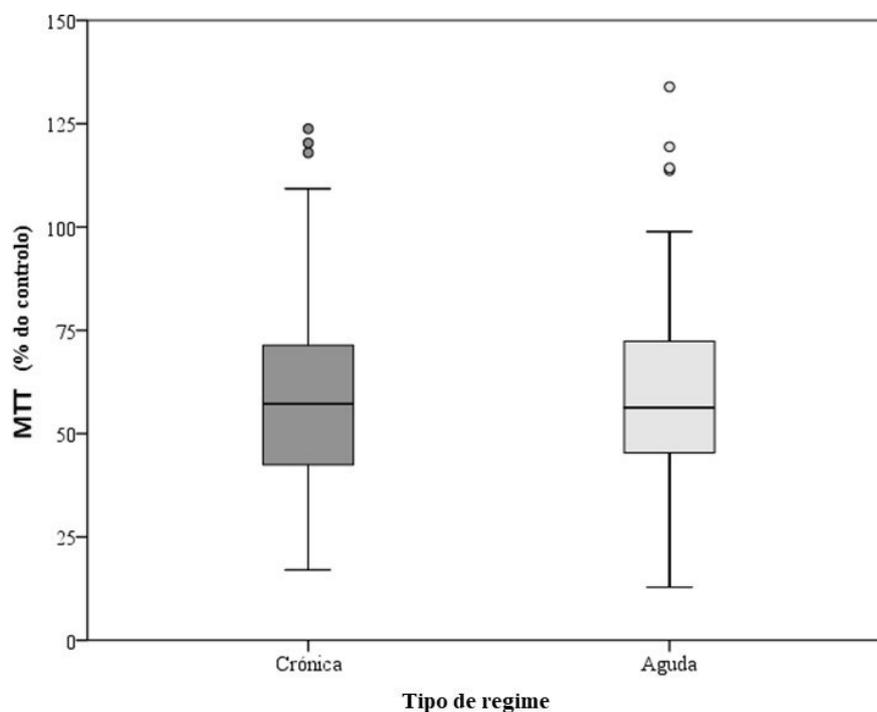


Figura 10 – Gráfico relativo à análise de viabilidade celular das células MCF-7 após administração diária de EGCG seguindo dois modelos de aplicação: crónica (manteve-se o meio de cultura e adicionou-se a dose de EGCG diariamente) e aguda (renovação diária do meio de cultura e da dose de EGCG). A análise estatística revelou que os modelos têm efeito semelhante $p = 0,752$.

b. Por número de aplicação (tempo)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12 e na Figura 11 pôde verificar-se que ao final de 2 aplicações, para ambos os modelos de aplicação (crónico e agudo), existe diferença estatisticamente significativa entre os dois modelos, $p = 0,029$. Ambos os modelos apresentaram valores abaixo dos 70% do valor médio dos controlos, mas o modelo de administração crónica das doses de EGCG mostrou ser mais eficaz ao fim de 2 aplicações do EGCG.

Tabela 12 – Análise comparativa da viabilidade celular das MCF-7 usando o teste de *Mann-Whitney* para os dois modelos de aplicação das doses de EGCG, em função do número de aplicações (tempo).

Tempo (dia)	Tipo	n	Min - Max	Média (DP)	Mediana [P25 - P75]	Valor de p
2	Crônica	84	24,72 - 123,78	60,79 (23,85)	56,11 [41,61 - 75,77]	0,029
	Aguda	84	25,01 - 98,44	65,98 (16,04)	64,95 [55,84 - 76,82]	
4	Crônica	84	30,96 - 98,51	51,49 (16,13)	48,35 [39,36 - 59,01]	0,336
	Aguda	84	12,85 - 98,88	53,24 (17,69)	51,12 [42,88 - 62,58]	
6	Crônica	84	17,04 - 120,33	66,22 (17,09)	65,13 [58,02 - 73,42]	0,005
	Aguda	84	27,94 - 133,92	59,51 (23,08)	53,57 [42,40 - 73,11]	

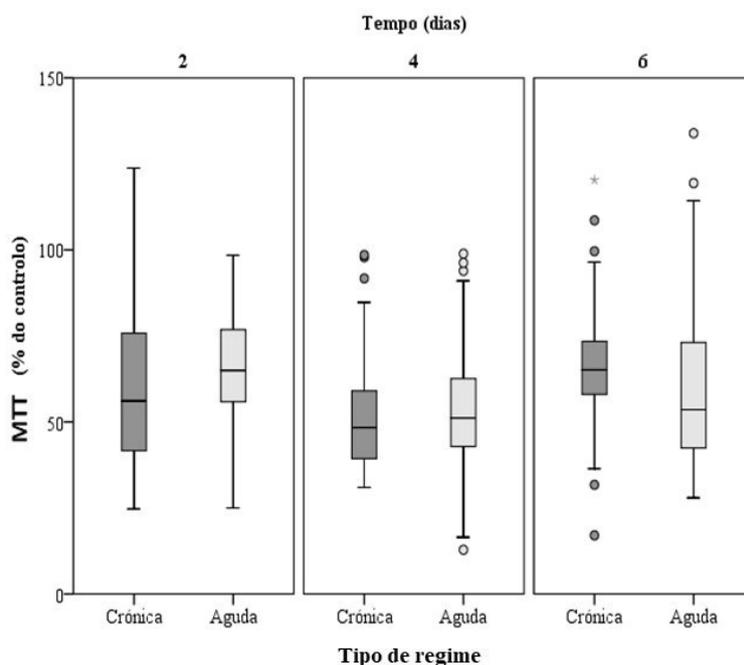


Figura 11 – Gráfico relativo à comparação da viabilidade celular das MCF-7 nos modelos crônico e agudo, sendo realizadas as comparações dos dois modelos ao fim de 2, 4 e 6 aplicações, ou seja, respectivamente, 3, 5 e 7 dias. Análise estatística comprovou a eficácia de ambos os modelos. Nota: *outliers extremos; °outliers moderados.

Após 4 aplicações de EGCG não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois modelos, $p = 0,336$, apresentado ambos valores abaixo dos 70% do valor médio dos controles, o que comprova a eficácia de qualquer um dos dois modelos.

Ao fim de 6 aplicações de EGCG para os dois modelos/tipo de regime, verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre eles, $p = 0,005$. O modelo agudo mostra maior eficácia do que o crônico, porém há que salientar a maior uniformidade dos resultados do modelo crônico para este tempo de duração do ensaio. Por outro lado, apesar de existir diferença estatisticamente significativa entre os dois modelos, ambos são eficazes para a

linha celular MCF-7, com valores abaixo dos 70% do valor médio dos controlos. Deste modo, em termos práticos, optou-se pela aplicação do modelo crónico que possibilita manter a eficácia do experimento com menos consumo, quer a nível dos reagentes e materiais utilizados, quer a nível do tempo e esforço despendidos para efetuar o procedimento.

c. Por extrato

A viabilidade celular da linha MCF-7, após aplicação dos extratos e usando os dois tipos de regime (crónico ou agudo), é semelhante. Para o GTEE não se encontrou diferença estatisticamente significativa consoante o modelo de aplicação (crónico *versus* agudo: $p=0,359$); porém, visualmente, pode observar-se que o modelo crónico obteve, nesta amostra, melhores resultados. Para o MGTE, não se encontraram também diferenças estatisticamente significativas entre os dois modelos ($p = 0,065$), mas pode observar-se que o modelo crónico conseguiu alcançar melhores resultados nesta amostra. Relativamente ao GTE pó também não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois modelos ($p=0,216$), mas tal como nos anteriores, o modelo crónico apresentou maior eficácia nesta amostra (Figura 12).

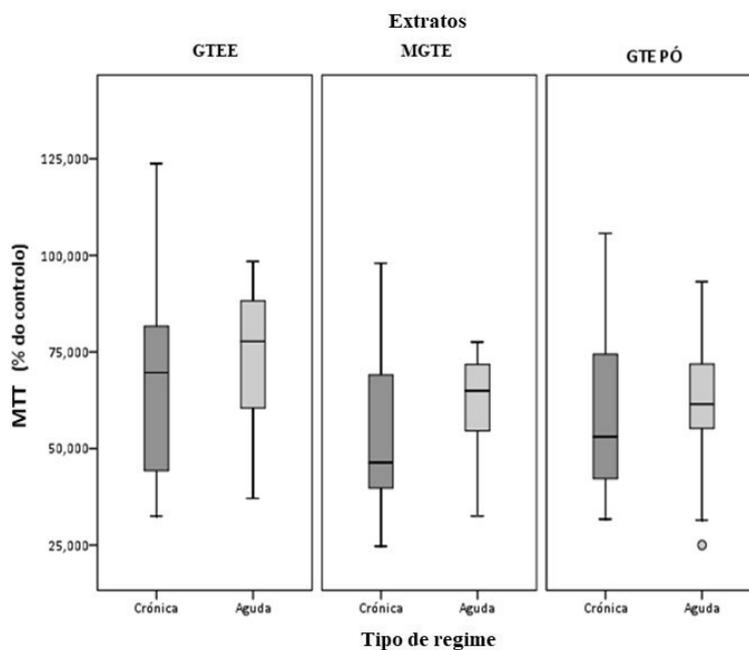


Figura 12 – Gráfico relativo à comparação da viabilidade das células MCF-7 após aplicação do modelo crónico e agudo para cada um dos extratos. Análise estatística mostrou eficácia de ambos os modelos.

Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os dois modelos para os diferentes extratos avaliados, pode observar-se, a partir do gráfico da Figura 12, que o modelo agudo apresenta uma menor dispersão nos resultados, mas o modelo crónico conseguiu atingir valores de viabilidade celular mais baixos para todas as substâncias analisadas.

Foi escolhido, para os estudos posteriores a esta etapa, o modelo de aplicação crónica.

4.4 Seleção da melhor concentração para cada extrato

Em cada um dos tempos (nº de aplicações) avaliados e para cada um dos extratos aplicados, comparou-se a viabilidade celular, medida em % do valor do MTT relativamente ao valor médio dos controlos da experiência, para as diferentes concentrações usadas, através do teste de *Kruskal-Wallis*. O objetivo era determinar qual a concentração (0,5; 1; 5 ou 10 µg/ml de EGCG) mais citotóxica para cada um dos extratos usados (GTEE, MGTE e GTE pó).

Usando o teste de *Kruskal-Wallis* foi possível identificar, para cada um dos extratos administrados, qual a concentração mais eficaz para a linha celular MCF-7 (Figura 13, Tabela 13).

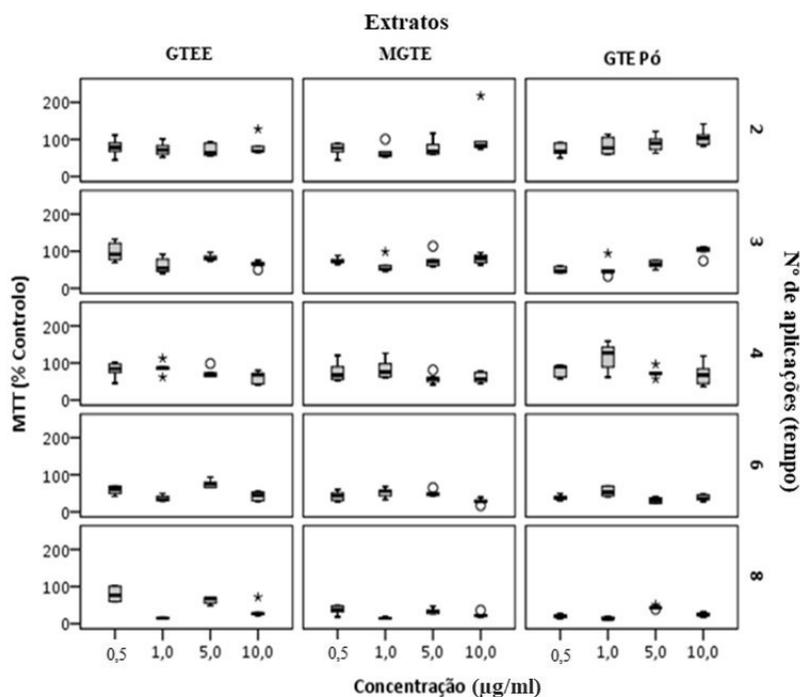


Figura 13 – Gráfico relativo à análise da viabilidade celular das MCF-7, comparando a eficácia das diferentes concentrações de EGCG para cada um dos extratos (GTEE, MGTE e GTE pó) ao fim de 2, 3, 4, 6 e 8 aplicações diárias. *outliers extremos; °outliers moderados.

De acordo com a Tabela 13, e com base nos valores de p obtidos, pode verificar-se que houve diferenças estatisticamente significativas na eficácia das diferentes concentrações de EGCG ao fim de 3, 6 aplicações diárias de GTEE. As diferentes concentrações de EGCG provenientes do MGTE apresentaram diferença significativa no fim de 6 aplicações. Quando se administrou GTE pó encontraram-se diferenças estatisticamente significativas na eficácia das diferentes concentrações ao fim de 3 e 6 aplicações.

Tabela 13 – Valores de p obtidos para a comparação dos valores de MTT entre as diferentes concentrações, para cada uma das substâncias administradas, ao final de 2, 3, 4 e 6 aplicações diárias.

Nº de aplicações (tempo)	GTEE	MGTE	GTE pó
2	0,717	0,143	0,121
3	0,009	0,106	0,001
4	0,096	0,120	0,087
6	0,001	0,010	0,007

Fez-se uma análise global, comparando as diferentes concentrações independentemente do tempo, para cada extrato.

- **GTEE**

A análise para GTEE demonstrou um valor $p < 0,001$ que indica a existência de diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à citotoxicidade das diferentes concentrações. Observando o gráfico da Figura 14 pode constatar-se que as concentrações de GTEE mais citotóxicas para as MCF-7 são as de 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$.

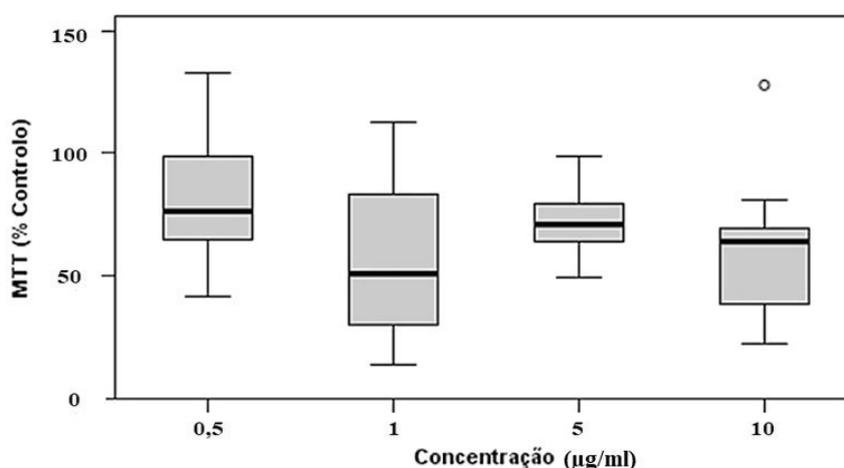


Figura 14 – Gráfico relativo à comparação do efeito das diferentes concentrações de EGCG presentes no GTEE sobre a viabilidade celular das células MCF-7 com aplicações diárias do mesmo. A análise estatística revelou que 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ são mais citotóxicas ($p < 0,001$).

- **MGTE**

Da análise comparativa da viabilidade celular para as diferentes concentrações de EGCG com MGTE obteve-se um valor de $p = 0,815$. Este valor significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre a citotoxicidade para diferentes concentrações. Assim, para o MGTE, é indiferente a concentração usada, ou seja, a eficácia relativamente à citotoxicidade e diminuição do crescimento celular das células MCF-7 existe sempre mas é semelhante (Figura 15).

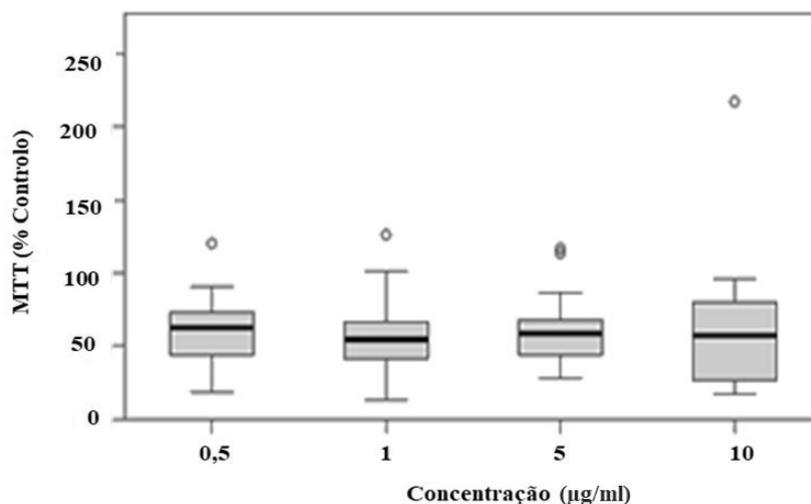


Figura 15 – Gráfico relativo à comparação da eficácia das diferentes concentrações de EGCG presentes no MGTE sobre a viabilidade celular das células MCF-7 com aplicações diárias do mesmo. A análise estatística não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações ($p = 0,815$).

- **GTE pó**

A análise comparativa das diferentes concentrações de GTE pó forneceu um valor de $p = 0,451$, o que indica que não existe diferença estatisticamente significativa em relação à eficácia das diferentes concentrações usadas. Desse modo, qualquer que seja a concentração de EGCG no GTE pó, mantém-se a citotoxicidade desejável para as células MCF-7 (valores de MTT a baixo 70% do valor médio dos controlos), inibindo o seu crescimento (Figura 16).

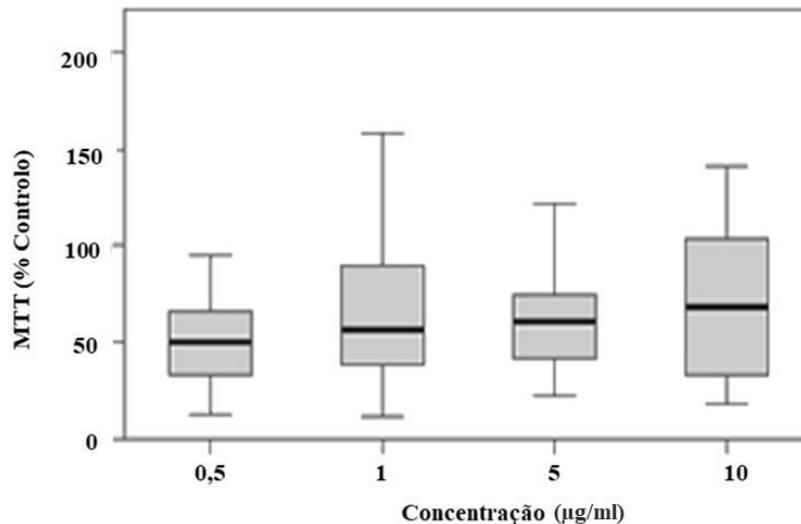


Figura 16 – Gráfico relativo à comparação da eficácia das diferentes concentrações de EGCG presentes no GTE pó sobre a viabilidade celular das células MCF-7 com aplicações diárias do mesmo. A análise estatística não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações ($p = 0,451$).

4.5 Influência do número de saquetas do chá *Lipton* avaliação pelo método do MTT

Além dos estudos realizados com extratos de chá verde, realizaram-se ensaios com infusões de chá verde da marca *Lipton*. O uso específico desta marca foi decidido após a realização de estudos anteriores, em que foi medida a concentração do composto EGCG em diferentes marcas de chá verde presentes no mercado (HPLC) e comprovada por ensaios *in vitro*. As análises com esta marca apresentaram a maior concentração do composto, sendo também aquela com a maior reprodutibilidade de resultados e garantia de qualidade do produto, tornando-a apta para a realização de experiências [112].

Avaliou-se a citotoxicidade do EGCG presente no chá verde *Lipton* sobre a linha celular MCF-7, utilizando infusões com diferentes concentrações de EGCG (0,5 e 5 µg/ml), preparadas com 1, 2 e 3 saquetas, com base em estudos anteriores, usando o teste de *Kruskal-Wallis* para análise estatística dos resultados [112].

Após o tempo de adesão de 72 horas, procedeu-se ao protocolo de aplicação crónica do composto com doses diárias num total de 6 aplicações (7 dias) (Figura 17).

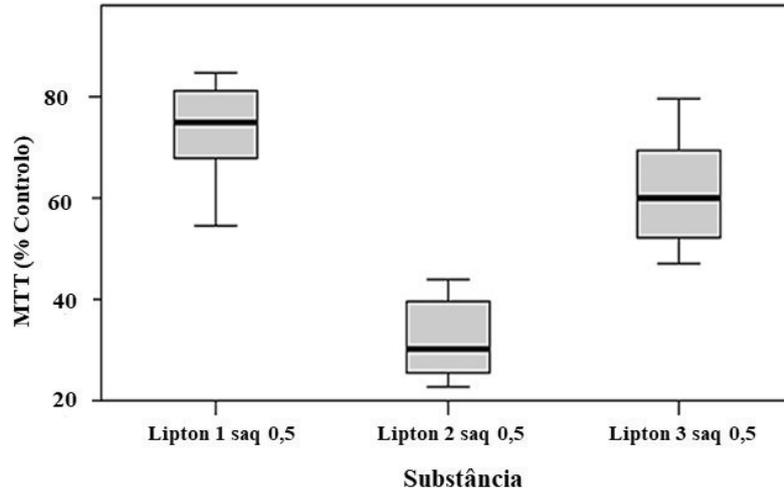


Figura 17 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular da linha celular MCF-7 (valores de MTT padronizados à % do valor médio dos controles) após aplicação diária de infusões de chá verde *Lipton* preparados com 1, 2 e 3 saquetas, com concentração de 0,5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). O teste de *Kruskal-Wallis* comprovou eficácia do chá verde *Lipton* sobre as células MCF-7.

A comparação da viabilidade celular usando 1, 2 e 3 saquetas de chá verde *Lipton*, revelou que existe diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular consoante se usam 1, 2 ou 3 saquetas com 0,5 µg/ml de EGCG ($p < 0,001$). Mais especificamente, existe diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular desta linha entre a utilização de 1 ou de 2 saquetas de chá *Lipton* com 0,5 µg/ml de EGCG ($p < 0,001$) e entre a utilização de 2 e 3 saquetas de chá *Lipton* com 0,5 µg/ml de EGCG ($p = 0,003$). Constatase visualmente na Figura 17, que a utilização de 2 saquetas de chá verde *Lipton* é a mais citotóxica, apresentando valores de MTT abaixo dos 40% do valor médio dos controlos da experiência. Pode verificar-se que já a utilização de 1 ou 3 saquetas com 0,5 µg/ml de EGCG é citotóxica para a linha celular MCF-7, comprovando a eficácia do EGCG no próprio chá na inibição do crescimento das células MCF-7 do cancro da mama.

Foi também comparada a utilização de 2 e de 3 saquetas de chá verde *Lipton* com a concentração de 5 µg/ml de EGCG. Aumentado a concentração do EGCG o teste de *Mann-Whitney* retornou a um valor de $p = 0,583$, ou seja, não significativo, o que demonstrou que a citotoxicidade da utilização de 2 ou 3 saquetas de chá verde *Lipton* com esta concentração é semelhante (Figura 18).

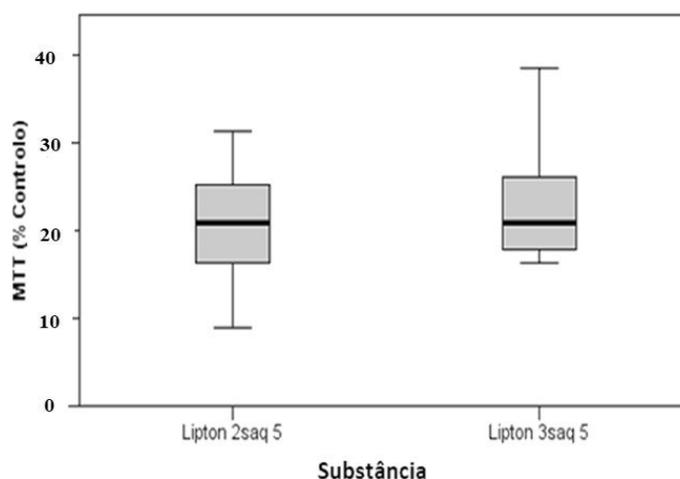


Figura 18 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular da linha celular MCF-7 (valores de MTT padronizados à % do valor médio dos controles) após aplicação diária de infusões de chá verde *Lipton* preparadas com 2 e 3 saquetas, com concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Usando o teste de *Mann-Whitney* verificou-se que têm efeito semelhante ($p = 0,583$).

De forma a selecionar a concentração com maior citotoxicidade para a linha celular MCF-7, quando se usou chá verde *Lipton* preparado com 2 ou 3 saquetas, foi comparada a viabilidade celular (em % do controlo médio da experiência) relativamente ao chá preparado nas concentrações de 0,5 ou de 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG, dado que já se tinha verificado que a utilização de 2 saquetas, relativamente à utilização de 3 saquetas, é mais citotóxica para a linha celular MCF-7, quando usada a concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG, e que a citotoxicidade da utilização de 2 ou de 3 saquetas é semelhante, quando usada a concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG.

Quando se utilizam 2 saquetas de chá verde *Lipton* observa-se que existe diferença estatisticamente significativa na citotoxicidade relativamente às duas concentrações de EGCG utilizadas ($p = 0,002$). Conforme se pode observar na Figura 19, a concentração mais eficaz foi a de 5 $\mu\text{g/ml}$, embora ambas sejam citotóxicas para a linha celular, uma vez que mesmo para a concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ os valores da viabilidade são inferiores a 40% do valor médio dos controlos.

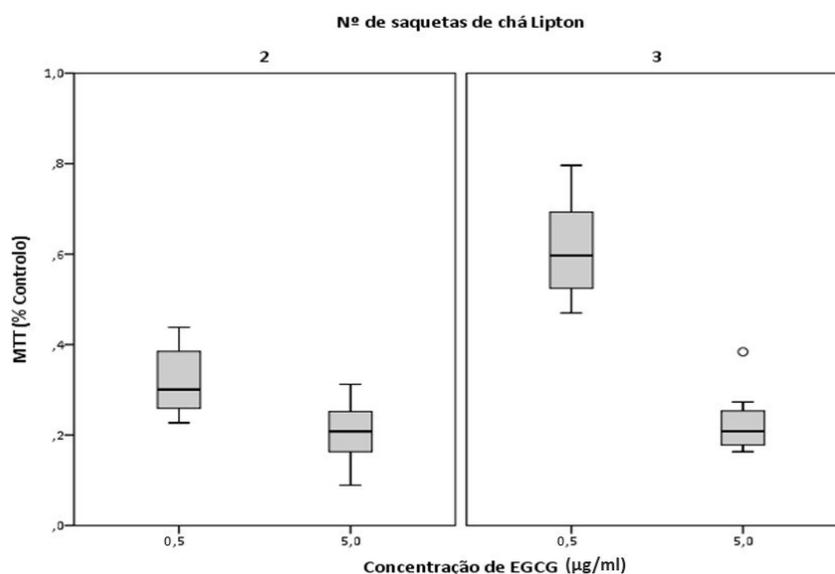


Figura 19 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 (valores de MTT padronizados a % do valor médio dos controlos) após aplicação diária de infusões de chá verde *Lipton* preparado com 2 e com 3 saquetas, comparando as concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Utilizando o teste de *Mann-Whitney* verificou-se que chá verde *Lipton* preparado com 2 saquetas é mais eficaz. Os valores de **p** foram $p = 0,002$ e $p < 0,001$, respetivamente, para 2 e 3 saquetas.

Quando se usaram 3 saquetas de chá verde *Lipton* verificou-se igualmente que existe diferença estatisticamente significativa na eficácia das duas concentrações ($p < 0,001$), com vantagem para a concentração de 5 µg/ml, que apresenta uma viabilidade celular das células MCF-7 abaixo dos 30% do valor médio dos controlos (Figura 19).

Não foi possível realizar a análise comparativa das concentrações com a utilização de 1 saqueta de chá verde *Lipton* devido à contaminação do ensaio que continha as amostras das células MCF-7 incubadas com chá *Lipton* 1 saqueta a 5 µg/ml de EGCG.

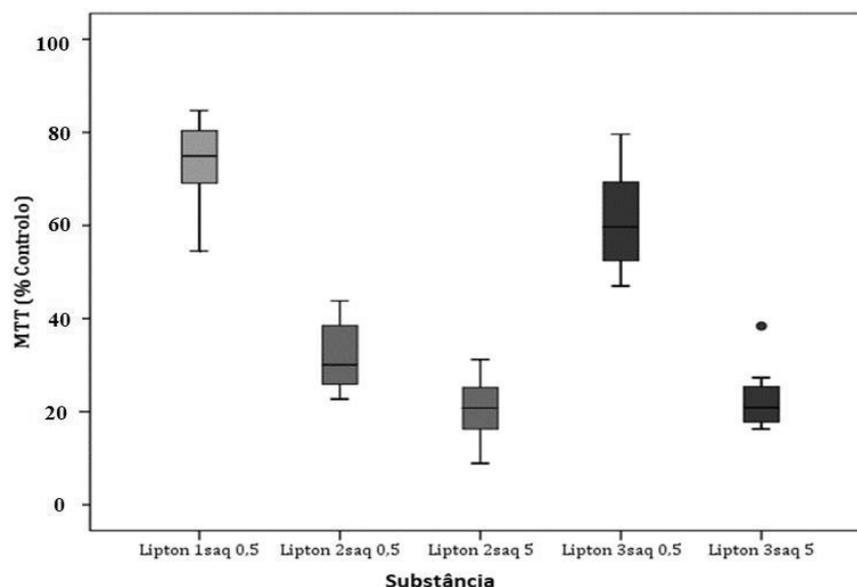


Figura 20 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação diária de infusões de chá verde *Lipton* preparadas com 1, 2 e 3 saquetas, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).

Com estes resultados comprova-se a eficácia do chá verde *Lipton* (preparado com 1, 2 e 3 saquetas) relativamente à inibição do crescimento e citotoxicidade para a linha celular do cancro da mama MCF-7.

4.6 Avaliação da ação isolada e associada ao EGCG para cada um dos fármacos utilizados

Avaliou-se também a ação isolada de fármacos utilizados nos protocolos de quimioterapia do cancro da mama e a sua ação associada ao GTE em pó com diferentes concentrações de EGCG (0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$). Estes ensaios foram desenhados para tentar verificar se a associação ao GTE pode potenciar a ação citotóxica do fármaco, aumentando a sua eficácia no combate ao cancro.

4.6.1 5-fluorouracilo (5-FU)

Aplicou-se a monoterapia com este fármaco do tipo antimetabólitos seguindo o protocolo de aplicação única (500 mg/m^2) para o período de incubação de 7 dias selecionado.

Analisou-se a sua ação isolada e associada com GTE em pó, em diferentes concentrações de EGCG (0,5 e 5 µg/ml), aplicado diariamente num total de 6 aplicações (7 dias). Assim, usando o teste de *Kruskal-Wallis*, foram efetuados três grupos de comparações: *comparação 1*: 5-Fu, GTE pó 0,5 e 5-FU+GTE pó 0,5; *comparação 2*: 5-FU, GTE pó 5 e 5-FU+GTE pó 5; *comparação 3*: 5-FU+GTE pó 0,5 e 5-FU+GTE pó 5 (Figuras 21-24, Tabelas 14 e 15).

Comparação 1

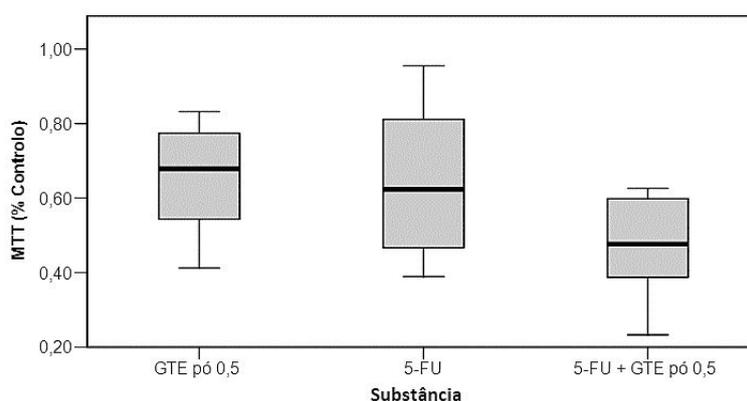


Figura 21 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de 5-FU, avaliando a sua ação isolada e em associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 0,5 µg/ml de EGCG num total de 6 (7 dias). Ver valores *p* das comparações na Tabela 14.

Efetuuou-se o teste de *Kruskal-Wallis* para comparar a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, bem como a eficácia da associação dos dois (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados referentes à análise estatística do 5-FU e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.

Comparação		Valores de p
Amostra 1	Amostra 2	
5-FU	GTE pó 0,5	1,000
5-FU+GTE pó 0,5	5-FU	0,056
5-FU+GTE pó 0,5	GTE pó 0,5	0,021

Comparação 2

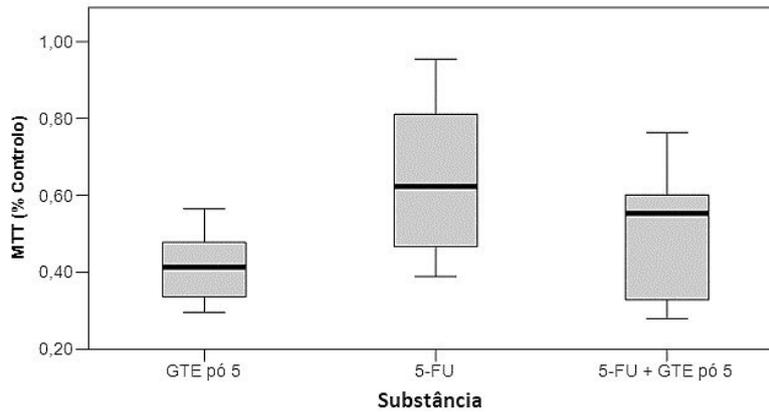


Figura 22 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua ação isolada e em associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Ver valores de *p* das comparações na Tabela 15.

Usou-se o teste de *Kruskal-Wallis* para comparar a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, bem como a eficácia da associação dos dois (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultados referentes à análise estatística do 5-FU e do GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG.

Comparação		Valores de <i>p</i>
Amostra 1	Amostra 2	
5-FU	GTE pó 5	0,007
5-FU+GTE pó 5	5-FU	0,423
5-FU+GTE pó 5	GTE pó 5	0,336

Comparação 3

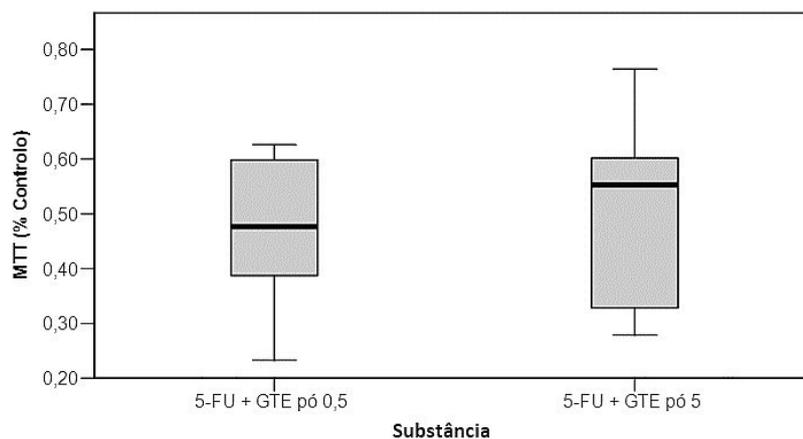


Figura 23 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Usando o teste de *Mann-Whitney* obteve-se $p = 0,817$.

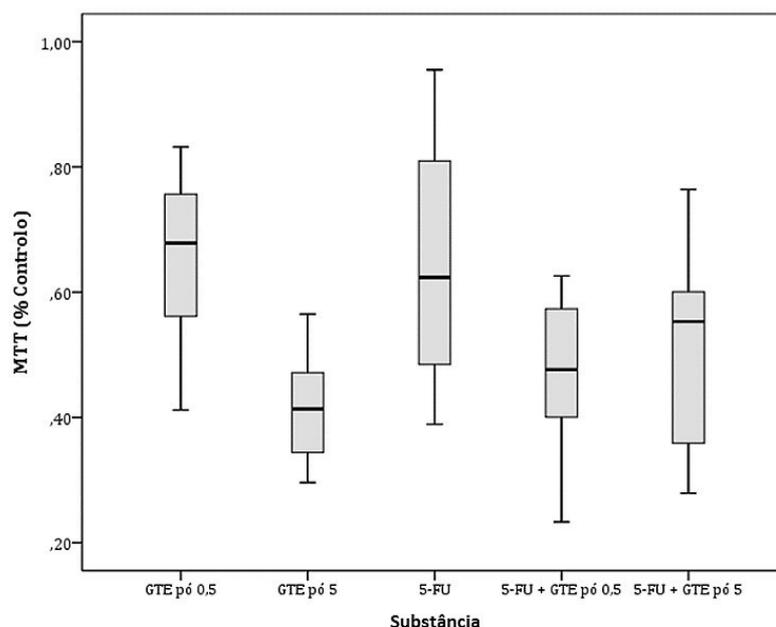


Figura 24 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única do 5-FU, avaliando a sua ação isolada e em associação com GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias).

A análise dos dados do ensaio permitiu verificar que o GTE em pó na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG mostrou ser mais eficaz que o 5-FU aplicado isoladamente, $p = 0,007$. A associação de 5-FU ao GTE em pó com as diferentes concentrações pareceu ser visualmente mais eficaz que o 5-FU aplicado isoladamente, porém a diferença não foi significativa, mas aumentando o número de amostras poderá ter uma resposta mais significativa tendendo para uma maior eficácia da associação.

Relativamente à comparação das duas associações, 5-FU+GTE pó 0,5 e 5-FU+GTE pó 5, não se obtiveram diferenças significativas, $p = 0,817$, sendo igualmente citotóxicas para a linha celular.

Em suma, as associações 5-FU + GTE pó nestas condições mostraram ser visualmente mais eficazes que o 5-FU sozinho, contudo as diferenças não foram estatisticamente significativas. Será necessário prosseguir com estes estudos de forma a ter amostras de maior dimensão, para que os efeitos biológicos observados, que são relevantes, se tornem também estatisticamente relevantes.

4.6.2 Capecitabina (CAP)

Usando a monoterapia com este fármaco do tipo antimetabólitos numa única aplicação (1 000 mg/m²) analisou-se a sua ação isolada e associada a GTE em pó com diferentes concentrações de EGCG (0,5 e 5 µg/ml) num total de 6 aplicações (7 dias). Assim, usando o teste de *Kruskal-Wallis*, foram efetuados três grupos de comparações: *comparação 1*: CAP, GTE pó 0,5 e CAP+GTE pó 0,5; *comparação 2*: CAP, GTE pó 5 e CAP+GTE pó 5; *comparação 3*: CAP+GTE pó 0,5 e CAP+GTE pó 5 (Figuras 25-28, Tabelas 16 e 17).

Comparação 1

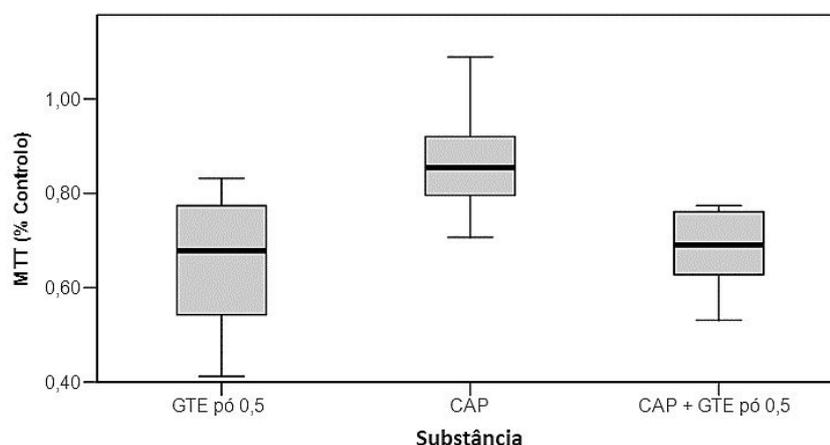


Figura 25 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando a sua ação isolada e em associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 0,5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Ver valores de **p** das comparações na Tabela 16.

Usou-se o teste de *Kruskal-Wallis* para comparar a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, bem como a eficácia da associação dos dois (Tabela 16).

Tabela 16 – Resultados referentes à análise estatística da CAP e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.

Comparação		Valores de p
Amostra 1	Amostra 2	
CAP	GTE pó 0,5	0,001
CAP+GTE pó 0,5	CAP	0,002
CAP+GTE pó 0,5	GTE pó 0,5	1,000

Comparação 2

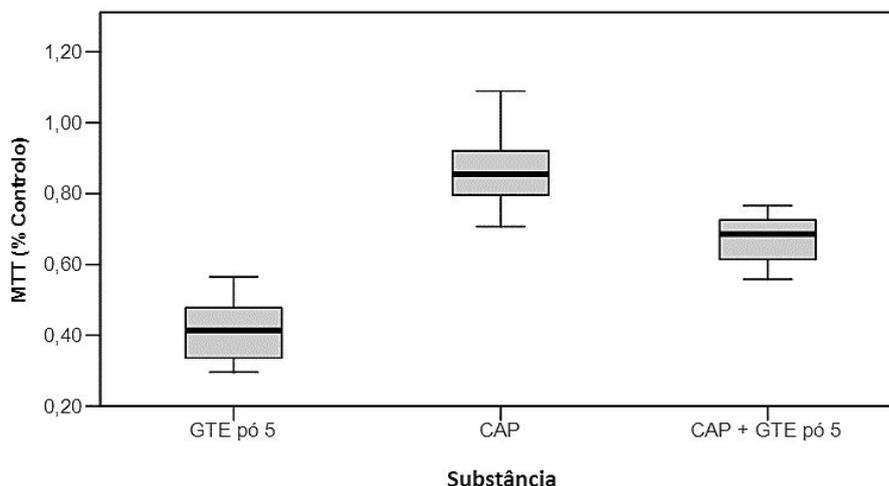


Figura 26 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando a sua ação isolada e a sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 5 µg/ml de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Ver valores de **p** das comparações na Tabela 17.

Usou-se o teste de *Kruskal-Wallis* para comparar a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, bem como a eficácia da associação dos dois (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultados referentes à análise estatística da CAP e do GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG

Comparação		Valores de p
Amostra 1	Amostra 2	
CAP	GTE pó 5	<0,001
CAP+GTE pó 5	CAP	0,037
CAP+GTE pó 5	GTE pó 5	0,011

Comparação 3

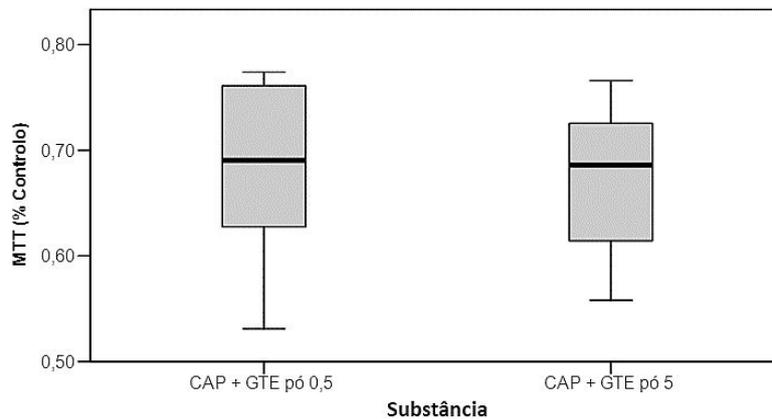


Figura 27 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG num total de 6 aplicações (7 dias). Usou-se o teste de *Mann-Whitney* e obteve-se $p = 0,470$.

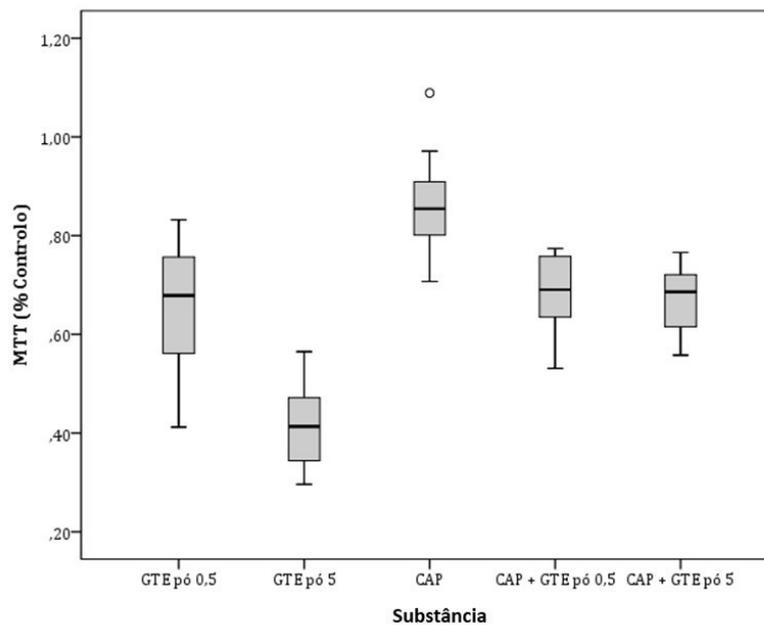


Figura 28 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da CAP, avaliando a sua ação isolada e a associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 dias.

A análise estatística demonstrou que o GTE em pó nas diferentes concentrações é mais eficaz que a CAP aplicada isoladamente, especialmente o GTE em pó com 5 $\mu\text{g/ml}$. As associações da CAP ao GTE em pó para as duas concentrações mostraram ser mais citotóxicas que a CAP sozinha e, as duas associações não apresentaram diferenças significativas, ou seja, tiveram efeito semelhante.

Dados os resultados obtidos, as associações CAP+GTE pó mostram que a CAP tem a sua eficácia potenciada pelo EGCG, ou seja, as associações são mais citotóxicas para a linha celular MCF-7 que a CAP sozinha. Demonstra-se portanto, o possível papel adjuvante do EGCG na terapêutica do cancro da mama em associação à CAP.

4.6.3 Docetaxel (DOT)

Aplicando a monoterapia com este fármaco do tipo taxano, efetuando uma única aplicação (60 mg/m^2), analisou-se a sua ação isolada e associada a GTE em pó com diferentes concentrações de EGCG (0,5 e $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$) para o período de incubação de 7 dias (6 aplicações). Assim, usando o teste de *Kruskal-Wallis* para o fármaco foram efetuados três grupos de comparações: *comparação 1*: DOT, GTE pó 0,5 e DOT+GTE pó 0,5; *comparação 2*: DOT, GTE pó 5 e DOT+GTE pó 5; *comparação 3*: DOT+GTE pó 0,5 e DOT+GTE pó 5 (Figuras 29-32, Tabela 18).

Comparação 1

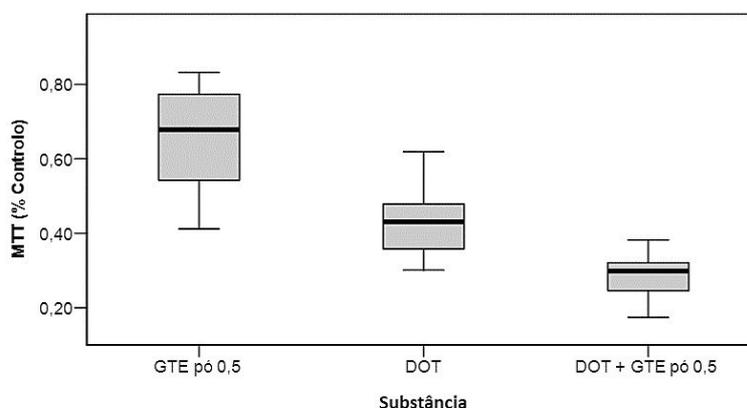


Figura 29 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua ação isolada e a associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Ver valores de *p* das comparações na Tabela 18.

Usando o teste de *Kruskal-Wallis* foi comparada a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, bem como a eficácia da associação dos dois (Tabela 18).

Tabela 18 – Resultados referentes à análise estatística de DOT e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.

Comparação		Valores de p
Amostra 1	Amostra 2	
DOT	GTE pó 0,5	0,022
DOT+GTE pó 0,5	DOT	0,051
DOT+GTE pó 0,5	GTE pó 0,5	<0,001

Comparação 2

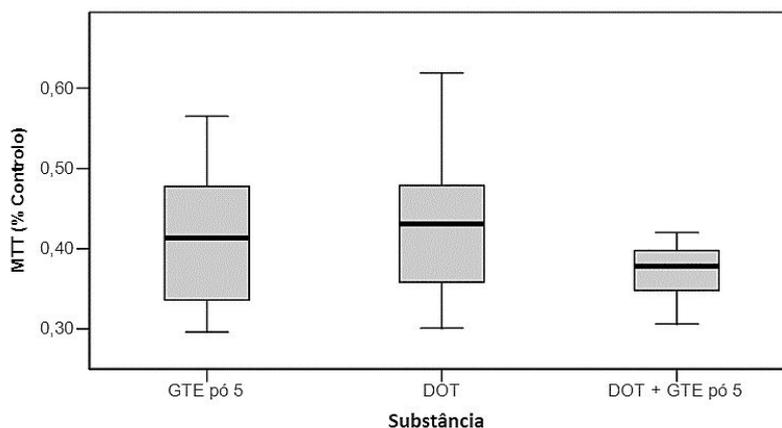


Figura 30 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua ação isolada e em associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Usando o teste de *Kruskal-Wallis* comparou-se a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó e a eficácia da associação dos dois, $p = 0,319$.

Comparação 3

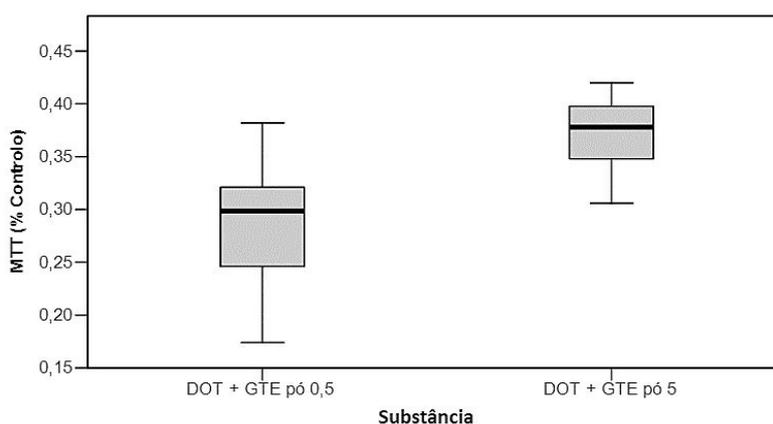


Figura 31 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Usando o teste de *Mann-Whitney* obteve-se $p = 0,001$.

Apesar de aparentarem melhor eficácia a nível estatístico, as associações não mostram diferenças significativas em relação à DOT. Comparando as duas associações verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa, $p = 0,001$, em que a associação DOT+GTE pó 0,5 mostrou ser mais citotóxica do que a com maior concentração de EGCG e, visualmente, aparentou ser mais citotóxica que as demais (Figura 32).

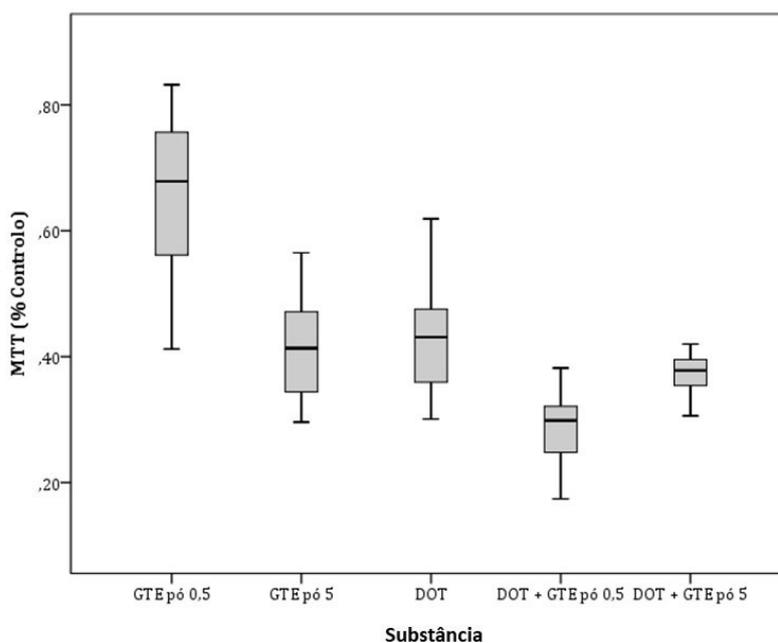


Figura 32 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOT, avaliando a sua ação isolada e a associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações.

Para o DOT as associações (DOT+GTE pó) demonstram ser mais citotóxicas visualmente, mas as diferenças não são estatisticamente significativas. Contudo se se necessário aumentar o número de amostras é possível que estas diferenças possam vir a ser significativas. Como foi referido na revisão da literária, noutras linhas celulares os taxanos tiveram a sua ação potenciada pelo EGCG.

4.6.4 Paclitaxel (PAX)

Usando a monoterapia com este fármaco do tipo taxano com uma única aplicação (175 mg/m^2) fez-se a análise da sua ação isolada e associada a GTE em pó com diferentes

concentrações de EGCG (0,5 e 5 µg/ml) para 6 aplicações de GTE pó (7 dias). Assim, usando o teste de *Kruskal-Wallis* para os ensaios com este fármaco, foram efetuados três grupos de comparações: *comparação 1*: PAX, GTE pó 0,5 e PAX+GTE pó 0,5; *comparação 2*: PAX, GTE pó 5 e PAX+GTE pó 5; *comparação 3*: PAX+GTE pó 0,5 e PAX+GTE pó 5 (Figuras 33-36, Tabelas 19 e 20).

Comparação 1

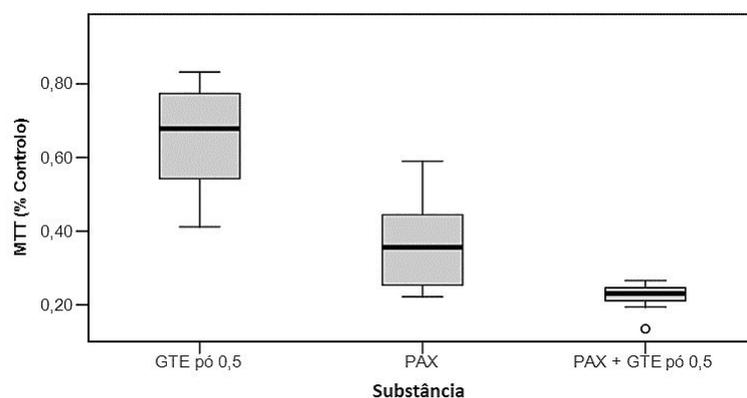


Figura 33 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 0,5 µg/ml de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Ver valores de *p* das comparações na Tabela 19.

Usando o teste de *Kruskal-Wallis* comparou-se a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, bem como a eficácia da associação dos dois (Tabela 19).

Tabela 19 – Resultados referentes à análise estatística de PAX e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.

Comparação		Valores de <i>p</i>
Amostra 1	Amostra 2	
PAX	GTE pó 0,5	0,016
PAX+GTE pó 0,5	PAX	0,057
PAX+GTE pó 0,5	GTE pó 0,5	<0,001

Comparação 2

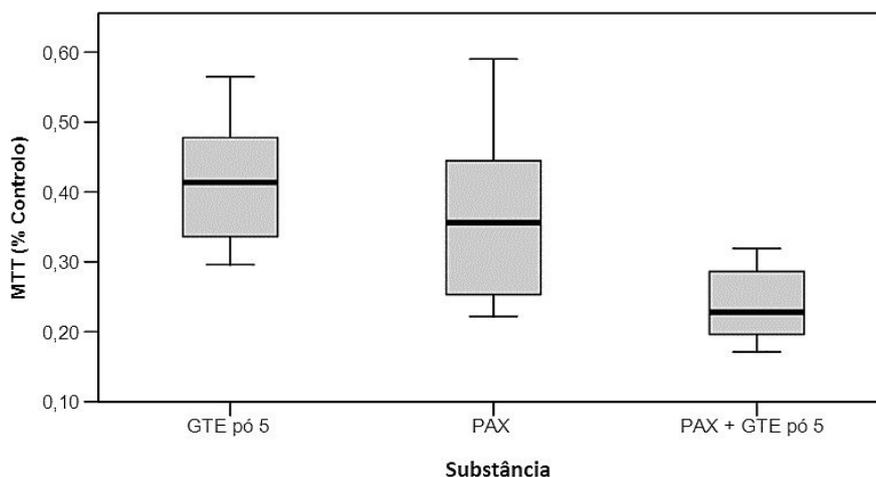


Figura 34 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações). Ver valores de **p** das comparações na Tabela 20.

Usando o teste de *Kruskal-Wallis* para comparar a eficácia isolada do fármaco e do GTE em pó, e a eficácia da associação dos dois (Tabela 20).

Tabela 20 – Resultados referentes à análise estatística de PAX e do GTE em pó com 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG.

Comparação		Valores de p
Amostra 1	Amostra 2	
PAX	GTE pó 5	0,808
PAX+GTE pó 5	PAX	0,008
PAX+GTE pó 5	GTE pó 5	<0,001

Comparação 3

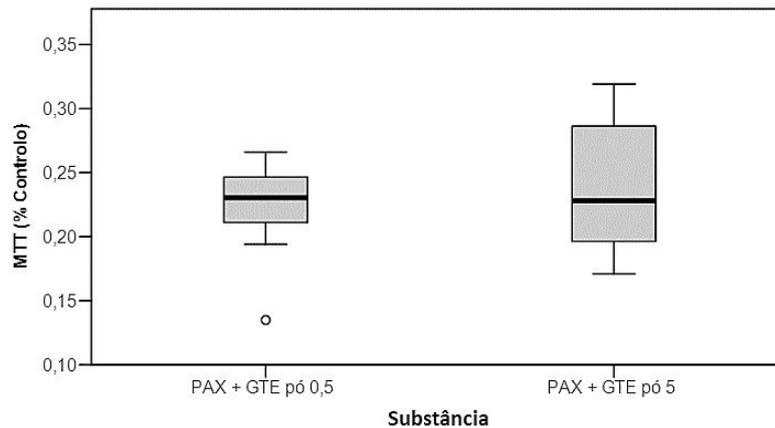


Figura 35 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações. Usando o teste de *Mann-Whitney* obteve-se $p = 0,954$.

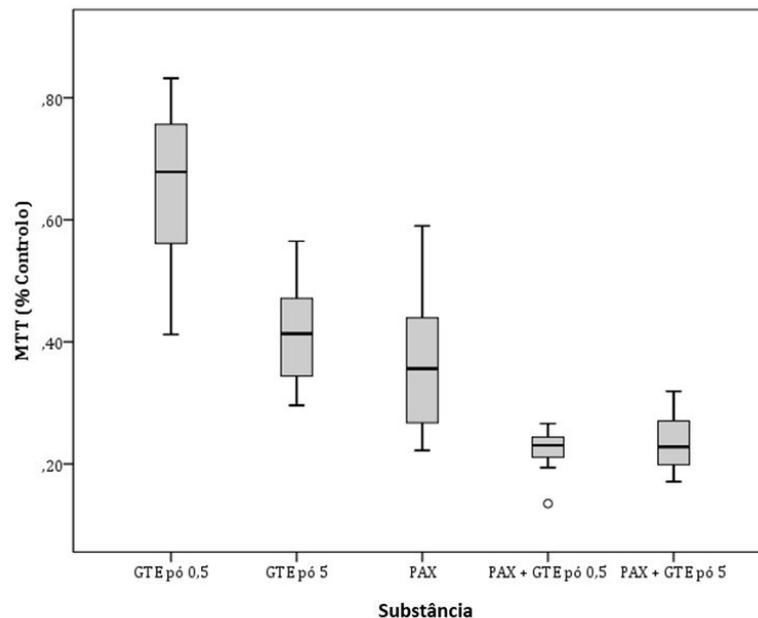


Figura 36 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de PAX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 7 dias (6 aplicações).

Os ensaios com Paclitaxel mostraram que a associação PAX+GTE pó com 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG apresentou maior citotoxicidade que o PAX isoladamente, $p = 0,008$, o que demonstra que a associação potencializou o efeito citotóxico do Paclitaxel, que, por si, só já

apresenta elevada citotoxicidade. Visualmente (Figura 36) a associação PAX+GTE pó 0,5 também apresentou maior citotoxicidade, porém não chegou a ser estatisticamente significativa, $p = 0,057$, mas o valor de p está muito próximo de o ser. Será necessário fazer mais ensaios para consolidar os resultados.

Quanto à comparação das duas associações a diferença não foi significativa, apresentando a mesma eficácia para as duas concentrações de EGCG, $p = 0,954$.

Deste modo para o PAX a associação (PAX+GTE pó) potenciou a citotoxicidade do PAX, mas será necessário aumentar a dimensão das amostras de modo que o efeito biológico observado se torne estatisticamente relevante - verificar se o PAX tem a sua eficácia aumentada pelo EGCG na concentração 0,5 $\mu\text{g/ml}$, ou seja, se a sua eficácia é aumentada para doses fisiológicas do EGCG.

4.6.5 Doxorubicina (DOX)

Aplicando a monoterapia com este fármaco do tipo antraciclina, com uma única aplicação (60 mg/m^2) para o período de incubação de 7 dias (6 aplicações), analisou-se a sua ação isolada e associada a GTE em pó com diferentes concentrações de EGCG (0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$) aplicadas diariamente (6 aplicações). Assim, usando o teste de *Kruskal-Wallis* para este fármaco, foram efetuados três grupos de comparações: *comparação 1*: DOX, GTE pó 0,5 e DOX+GTE pó 0,5; *comparação 2*: DOX, GTE pó 5 e DOX+GTE pó 5; *comparação 3*: DOX+GTE pó 0,5 e DOX+GTE pó 5 (Figuras 37-40, Tabela 21).

Comparação 1

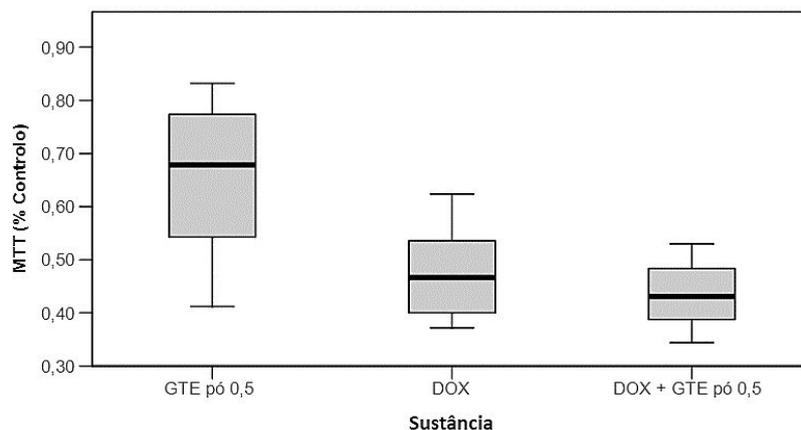


Figura 37 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 0,5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações. Ver valores de **p** das comparações na Tabela 21.

Usando o teste de *Kruskal-Wallis* comparou-se a eficácia isolada do fármaco e do GTE, assim como a eficácia da associação dos dois (Tabela 21).

Tabela 21 – Resultados referentes à análise estatística da DOT e do GTE em pó com 0,5 µg/ml de EGCG.

Comparação		Valores de p
Amostra 1	Amostra 2	
DOX	GTE pó 0,5	0,007
DOX+GTE pó 0,5	DOX	1,000
DOX+GTE pó 0,5	GTE pó 0,5	<0,001

Comparação 2

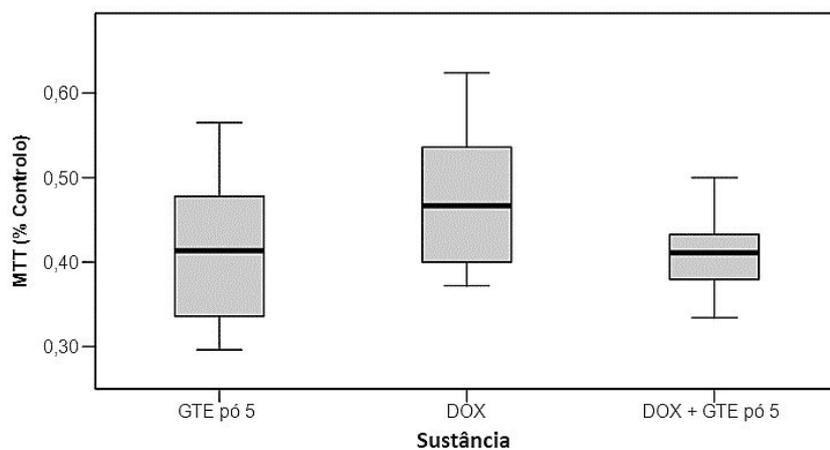


Figura 38 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações. Usando o teste de *Kruskal-Wallis* foi comparada a eficácia isolada do fármaco e do GTE, além da eficácia da associação dos dois, $p = 0,123$.

Comparação 3

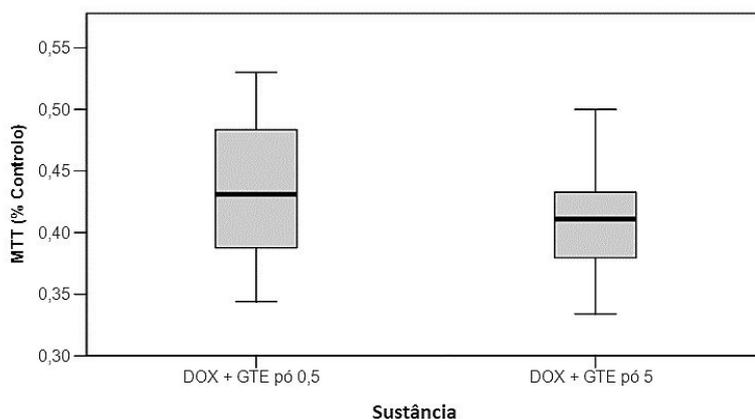


Figura 39 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de DOX, avaliando sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações. Usando o teste de *Mann-Whitney* obteve-se $p = 0,273$.

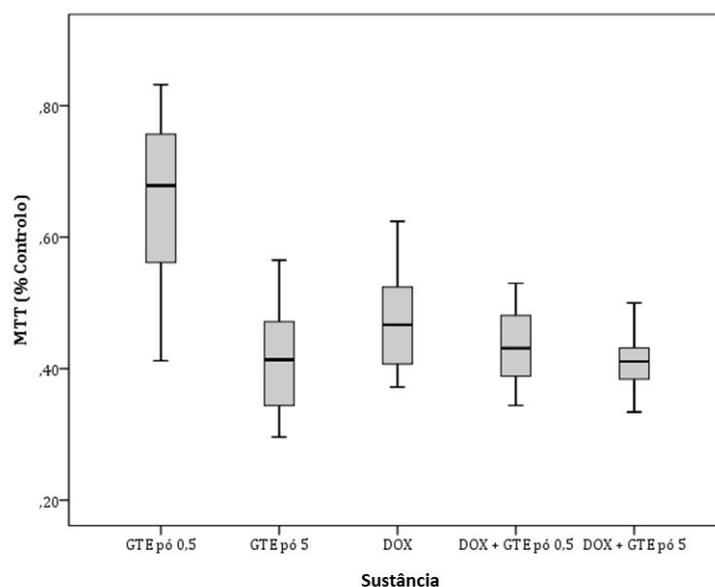


Figura 40 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única da DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação a GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações.

Para a Doxorubicina verificou-se, através da análise estatística, que não existe diferença estatisticamente significativa entre a DOX e as associações da DOX ao GTE em pó, $p=1,000$, e que não há diferença significativa entre as associações DOX+GTE pó 0,5 e DOX+GTE pó 5, $p = 0,273$. Pelo gráfico da Figura 39 pode observar-se que a associação aumentou a citotoxicidade, mas não para valores muito diferentes dos alcançados apenas com DOX.

Apesar das associações (DOX+GTE pó) parecerem visualmente mais citotóxicas, as diferenças não são estatisticamente significativas – é muito provável que exista uma melhor eficácia da DOX, mas só aumentando a dimensão da amostra se poderá comprovar estatisticamente o efeito biológico observado, considerado relevante.

4.6.6 Epirubicina (EPI)

Aplicando a monoterapia com este fármaco do tipo antraciclina com uma única aplicação (100 mg/m^2) para o período de incubação de 6 aplicações, analisou-se a sua ação isolada e associada ao GTE em pó, GTEE, EGCG-sigma e chá *Lipton* (1, 2 e 3 saquetas), com diferentes concentrações de EGCG (0,5 e 5 µg/ml) aplicado diariamente num total de 6 aplicações. A análise estatística foi realizada usando o teste de *Kruskal-Wallis*.

I. Epirrubicina e GTE em pó

Em relação à Epirrubicina e à associação de Epirrubicina com GTE em pó, a análise estatística mostrou que não existe diferença estatisticamente significativa entre a Epirrubicina e a Epirrubicina associada às diferentes concentrações testadas, inferindo-se que a associação não aumentou significativamente a citotoxicidade. No entanto, visualmente (Figura 41) pode observar-se que a associação a GTE em pó com 5 µg/ml de EGCG apresentou melhores resultados. Serão necessários mais ensaios.

Já as associações mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si, $p = 0,043$, com maior citotoxicidade para EPI+GTE pó com 5 µg/ml de EGCG.

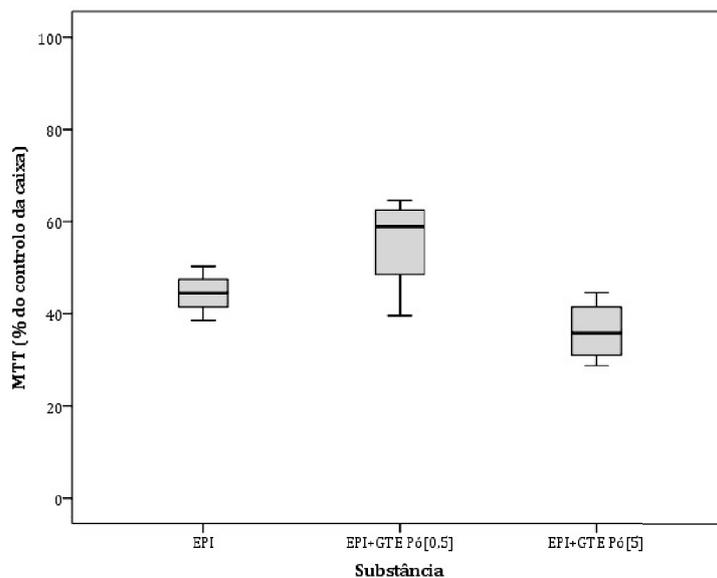


Figura 41 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações. Da comparação realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* obteve-se um valor de $p = 0,043$.

II. Epirrubicina e GTEE

Quanto à associação da Epirrubicina e cápsula de GTEE, a análise verificou que, apesar das duas associações serem aparentemente mais citotóxicas que a EPI, apenas para a de maior concentração de EGCG, ou seja, EPI+GTEE com 5 µg/ml de EGCG, houve diferença estatisticamente significativa em relação à EPI, $p = 0,024$ (Figura 42).

As duas associações, por outro lado, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre elas, $p = 1,000$, conseguindo ambas potencializar a eficácia do fármaco.

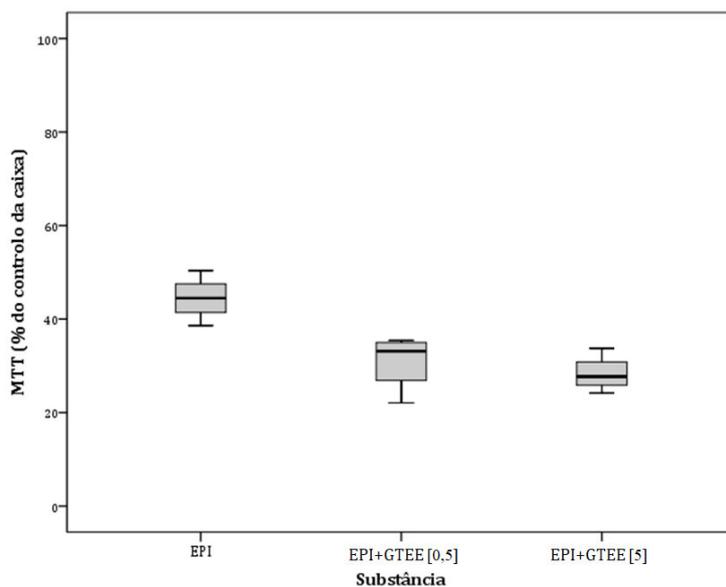


Figura 42 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao GTEE aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG ao longo de 6 aplicações. Da comparação realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* obteve-se um valor de $p = 1,000$.

III. Epirrubicina e EGCG-sigma

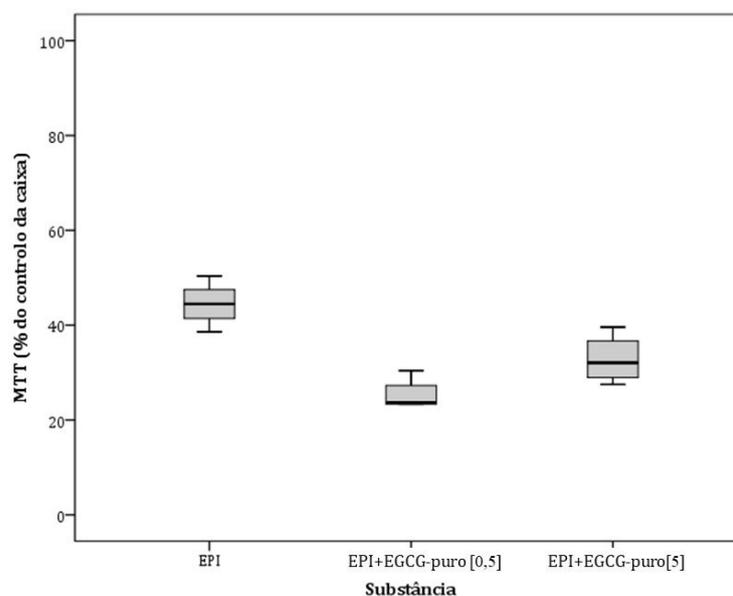


Figura 43 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao EGCG-sigma aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações. Da comparação realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* obteve-se um valor de $p = 0,011$.

Considera-se que como o EGCG-sigma tem uma elevada pureza ($\geq 95\%$) é “puro”. A análise verificou que a associação de EPI+EGCG-sigma com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ mostrou ser mais citotóxica que a EPI aplicada isoladamente, $p = 0,011$ (Figura 43). Já com uma concentração mais baixa verificou-se que o próprio EGCG é capaz de potenciar a eficácia do agente quimioterapêutico.

IV. Epirrubicina e chá *Lipton*

Relativamente à Epirrubicina a análise estatística da sua associação ao chá *Lipton* demonstrou não haver diferença significativa entre uma aplicação isolada e em associação com diferentes tipos de preparação (1, 2 e 3 saquetas) na concentração 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG, $p = 0,650$, isto é, a associação a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ não aumentou a citotoxicidade do fármaco.

Aumentado a concentração de EGCG para 5 $\mu\text{g/ml}$ verificaram-se diferenças significativas para EPI+L2 [5] e EPI+L3 [5], $p = 0,006$, uma vez que o chá preparado com 2 saquetas foi menos citotóxico que o de 3 saquetas, mas as duas associações não mostraram ter diferenças significativas em relação à Epirrubicina aplicada isoladamente, p igual a 0,483 e 0,764, para 2 e 3 saquetas, respetivamente (Figura 44).

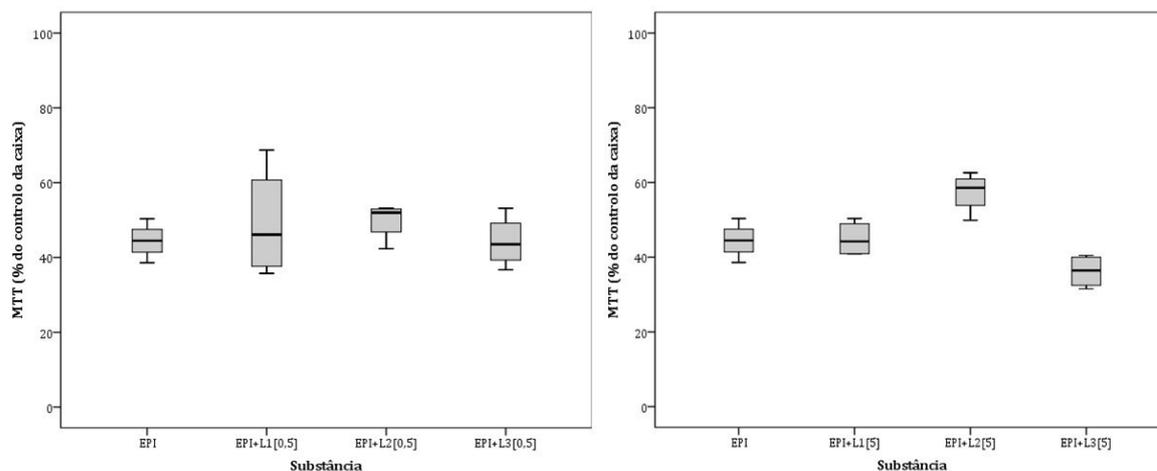


Figura 44 – Gráfico correspondente à análise de viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI, avaliando a sua ação isolada e em associação com chá Lipton (1, 2 e 3 saquetas) aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações. Ver os valores de **p** das comparações no texto.

No geral as associações (EPI+EGCG) (EGCG proveniente de diferentes fontes) com concentrações de EGCG similares às doses fisiológicas demonstraram a ação sinérgica do EGCG com a EPI. No entanto, como referido anteriormente para outros fármacos, é necessário aumentar a dimensão das amostras para que efeitos biológicos observados sejam comprovados estatisticamente como relevantes.

4.6.7 Epirrubicina & Doxorrubicina (EPI & DOX)

Tratando-se de compostos da mesma família, as antraciclina, pretendeu avaliar-se se o EGCG poderia ter uma ação diferente dependendo de uma ligeira alteração na estrutura do fármaco (Figura 45).

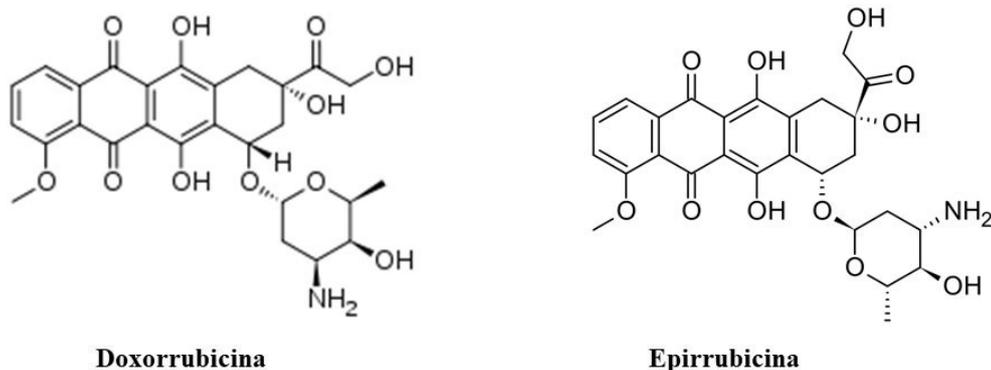


Figura 45 – Estrutura química de Doxorrubicina e Epirubicina, mostra claramente que são isômeros.

Analisou-se a ação do EGCG do GTE em pó, nas concentrações de 0,5 e 5 µg/ml, sobre a Epirubicina e a Doxorrubicina, para a linha celular MCF-7. A análise estatística mostrou que não existe diferença estatisticamente significativa entre a aplicação de EPI e DOX, $p=0,770$, o que significa que sobre esta linha celular os dois fármacos apresentaram efeito semelhante (Figura 46A).

Apesar da associação DOX+GTE pó 0,5 µg/ml ser aparentemente mais eficaz que a associação EPI+GTE pó 0,5 µg/ml, não tem significado estatístico, $p = 0,058$ (Figura 46B).

Relativamente a uma maior concentração de EGCG, a associação à EPI visualmente mostrou ser mais citotóxica que a associação à DOX, porém a diferença não é significativa, $p = 0,262$ (Figura 46C).

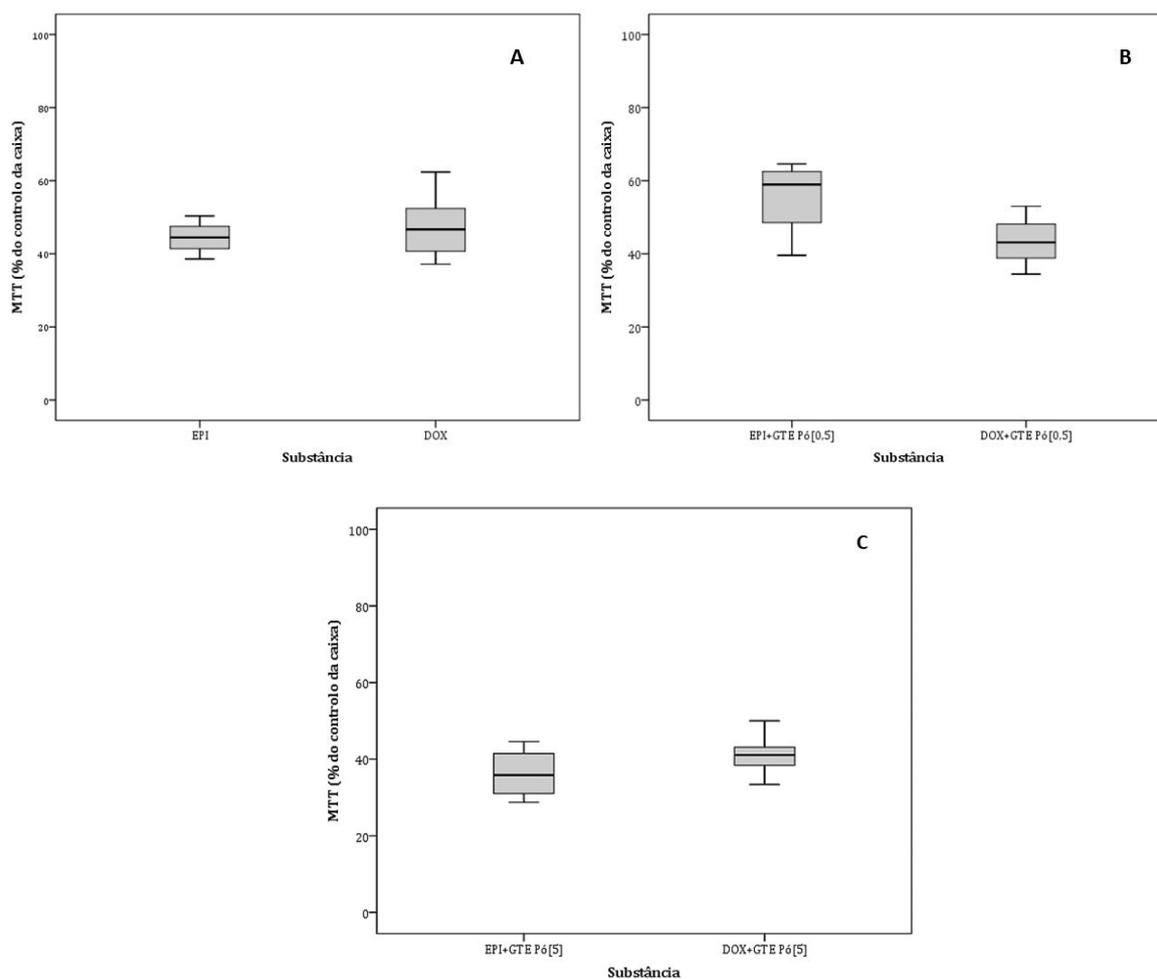


Figura 46 – Gráficos relativos à comparação da viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX, avaliando a sua ação isolada e da sua associação ao GTE em pó aplicado diariamente, com concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações. [A] viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX ao fim de 7 dias; [B] viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX seguida de GTE em pó com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações (7 dias); [C] viabilidade celular das MCF-7 após aplicação única de EPI e DOX seguida de GTE em pó com 5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG ao longo de 6 aplicações (7 dias). Para as diferentes comparações utilizando o teste de *Mann-Whitney* os valores de *p* foram 0,770; 0,058 e 0,262, respetivamente para A, B e C.

Conclui-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre a ação de EPI+EGCG e DOX+EGCG, ou seja, as duas associações apresentaram efeito citotóxico semelhante sobre a linha celular do cancro da mama MCF-7.

4.7 Avaliação do tipo de morte celular – Citometria de fluxo

Depois de se ter verificado que o EGCG proveniente de diferentes fontes mata seletivamente as células cancerígenas, quer aplicado isoladamente quer associado a agentes antineoplásicos, procurou-se determinar qual o tipo de morte celular induzido ao ser administrada uma terapia combinada de EGCG (diferentes fontes) + agente antineoplásico.

As combinações utilizadas continham EGCG, de diferentes fontes (extratos e infusões) com concentração de 0,5 e 5 µg/ml de EGCG, e mais alguns dos fármacos utilizados nos ensaios apresentados anteriormente: capecitabina, paclitaxel e docetaxel. Os dois primeiros foram combinados com GTE pó, GTEE e chá *Lipton* preparado com 2 e 3 saquetas, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml. Já o docetaxel foi combinado com GTE pó e chá *Lipton* preparado com 2 e 3 saquetas, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml.

Para este ensaio foram utilizadas placas de 6 poços, contendo aproximadamente 25×10^4 células por poço. Seguiu-se o mesmo protocolo que nas experiências anteriores: após um período de adesão das células 72 h iniciou-se a terapia com administrações diárias do EGCG e uma aplicação única do agente antineoplásico. Após serem feitas 6 aplicações de EGCG, ou seja, ao fim de 7 dias de experiência, realizou-se a citometria de fluxo utilizando dois marcadores (anexina V e iodeto de propídio), como referido anteriormente.

Os ensaios incluíram amostras de controlo, o agente antineoplásico sozinho e o agente associado ao EGCG, possibilitando a determinação do impacto do EGCG (diferentes fontes) na viabilidade celular (V), apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), nas diferentes concentrações (0,5 e 5 µg/ml de EGCG).

Relativamente à CAP observou-se que atuando isoladamente apresentou menor viabilidade celular do que as demais combinações ($p < 0,001$). Sozinha induziu mais mortes por apoptose inicial que em associação; a sua associação ao GTE pó na concentração 5 µg/ml induziu menos mortes que a de 0,5 µg/ml de EGCG ($p = 0,002$). As mortes por AT/N foram reduzidas quando a CAP atuou sozinha e ao ser associada aos compostos ($p = 0,013$). No caso da indução de necrose a associação com a concentração de 0,5 µg/ml aumentou o número de células por esse tipo de morte, mas com a de 5 µg/ml foi menor ($p < 0,001$) (Figura 47).

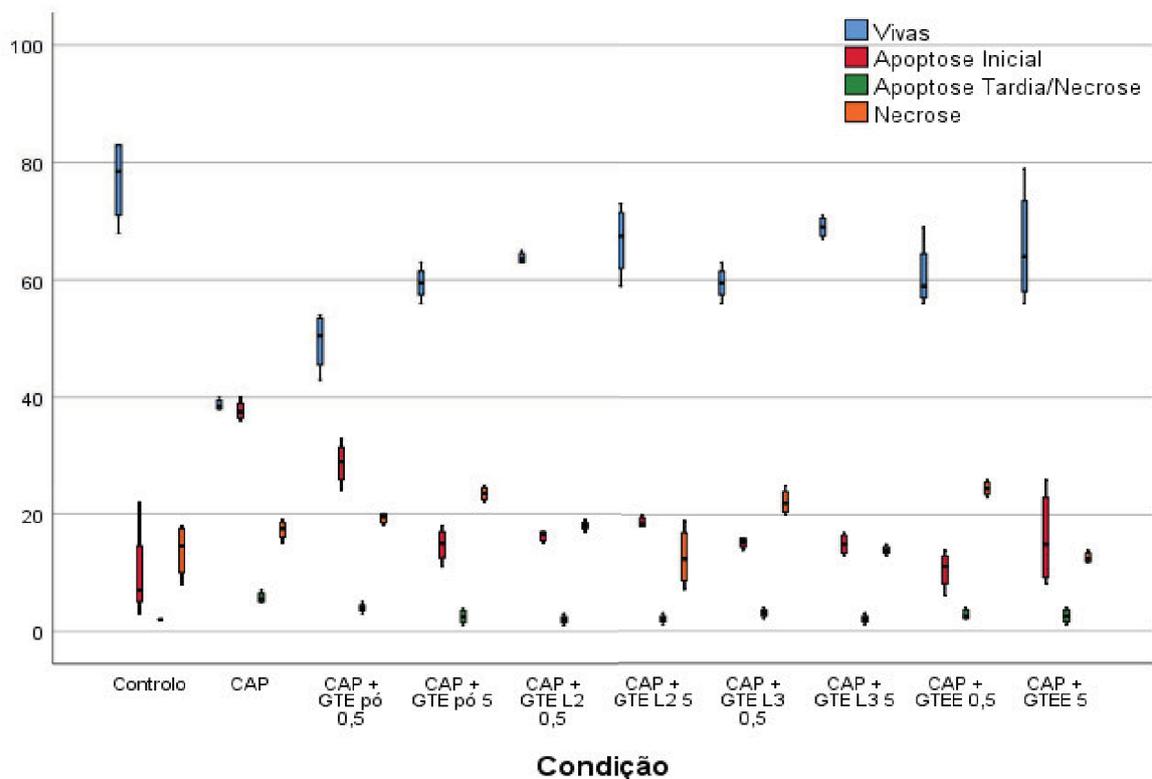


Figura 47 – Experiência de citometria de fluxo que mostra os diferentes tipos de morte celular para a amostra controlo, CAP aplicada sozinha e sua associação o GTE pó, chá *Lipton 2* e 3 saquetas e GTEE, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml. Valores **p** para as comparações: vivas $p < 0,001$; AI $p = 0,002$; AT/N $p = 0,013$ e N $p < 0,001$.

Quanto ao PAX, a sua associação ao GTE pó e a chá *Lipton 2* saquetas apresentou menor viabilidade celular que o PAX sozinho, sendo a concentração de 0,5 µg/ml mais eficaz ($p < 0,001$). Um facto bem evidente é que as mortes ocorrem preferencialmente por apoptose inicial independentemente do PAX estar sozinho ou associado e que as combinações com a concentração de 0,5 µg/ml de EGCG induziram mais mortes ($p < 0,001$). Mortes por AT/N no geral são muito poucas, o maior número foi apresentado para combinações com GTEE 0,5 µg/ml, GTE em pó 5 µg/ml e chá *Lipton 2* saquetas 5 µg/ml de EGCG ($p < 0,001$). Mortes por necrose também foram poucas, sendo indiferente ter sido aplicado isoladamente ou associado. Existem apenas diferenças significativas em relação ao controlo, que apresentou mais mortes por necrose que as condições impostas ($p = 0,005$) (Figura 48).

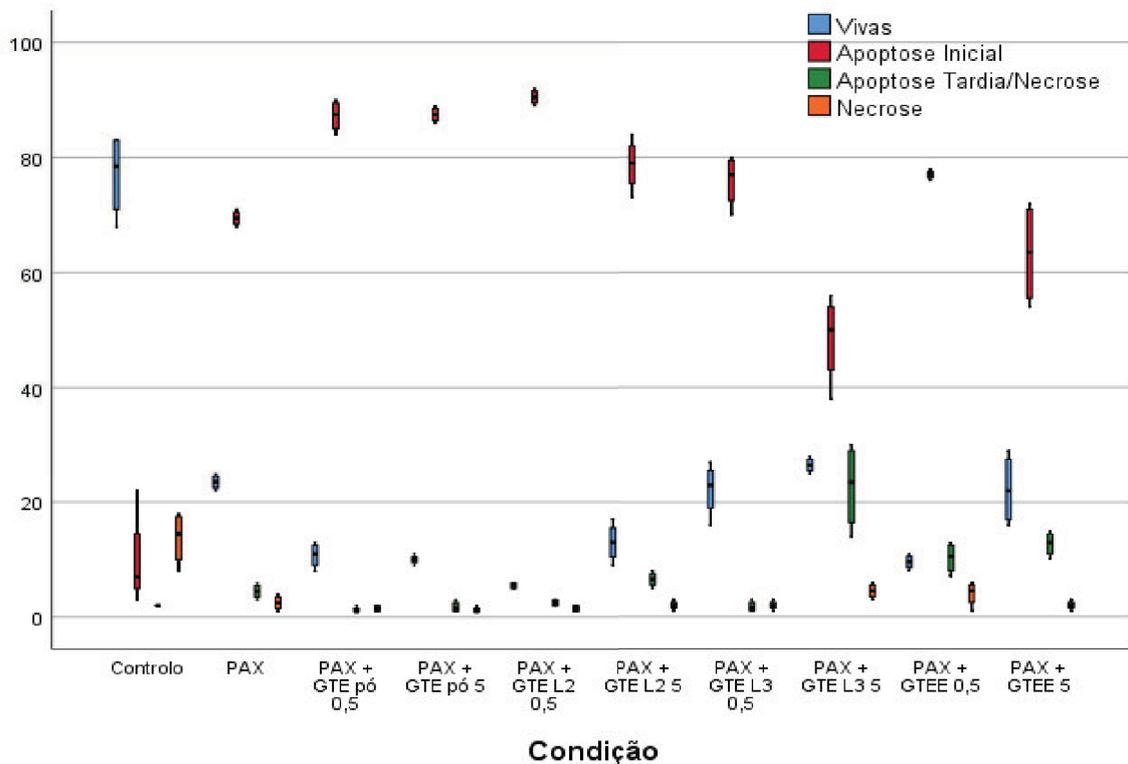


Figura 48 – Experiência de citometria de fluxo que mostra os diferentes tipos de morte celular para a amostra controlo, ao PAX aplicado sozinho e sua associação com GTE pó, chá *Lipton* 2 e 3 saquetas e GTEE, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml. Valores **p** das comparações: para as vivas $p < 0,001$; AI $p < 0,001$; AT/N $p < 0,001$ e N $p = 0,005$.

O Docetaxel administrado sozinho apresentou menor viabilidade que a sua associação ao GTE pó e chá *Lipton* 2 e 3 saquetas ($p < 0,001$). Mortes por apoptose inicial são em maior número quando o DOT esteve associado ao EGCG, para a concentração de 0,5 µg/ml a melhor associação foi com chá *Lipton* 3 saquetas e para a concentração de 5 µg/ml a associação com GTE pó foi a mais eficaz ($p = 0,018$). Tal como nos casos anteriores, as mortes por AT/N são muito poucas, no entanto existe diferença significativa entre DOT e DOT+L3 0,5 µg/ml, pois das combinações foi a que induziu menos morte por AT/N nas células em relação ao DOT ($p = 0,002$). As mortes por necrose foram induzidas em maior número pelo DOT sozinho; a combinação DOT+ L3 foi a que menos induziu morte por necrose ($p = 0,001$). Este é o tipo preferencial de morte celular do DOT, uma vez que foi o tipo de morte que o DOT isoladamente induziu nas células (Figura 49).

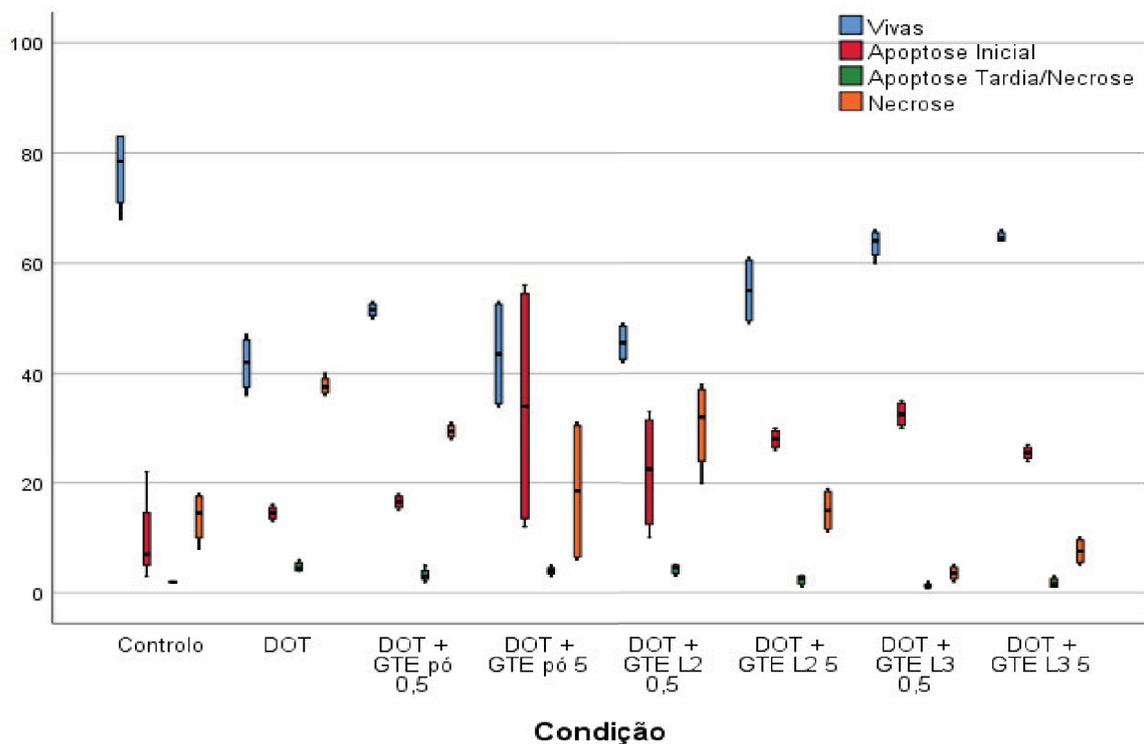


Figura 49 – Experiência de citometria de fluxo que mostra os diferentes tipos de morte celular para a amostra controlo, o DOT aplicado sozinho e sua associação com GTE pó, chá *Lipton* 2 e 3 saquetas, nas concentrações 0,5 e 5 $\mu\text{g/ml}$. Os valores *p* das comparações: vivas $p < 0,001$; AI $p = 0,018$; AT/N $p = 0,002$ e N $p = 0,001$.

Numa visão geral dos resultados da citometria para a análise do tipo de morte celular, a Capecitabina em associação com o EGCG não potenciou a capacidade de indução de morte por AI e AT/N, apenas houve alguma melhoria no que diz respeito à indução de necrose. São necessárias mais informações, nomeadamente, sobre a fase do ciclo celular, de modo a compreender melhor a influência do EGCG sobre a capecitabina nesta linha celular. Para o Paclitaxel as associações melhoraram o seu desempenho e potenciaram a indução da apoptose inicial, mostrando que a associação ao EGCG pode ser benéfica. Quanto ao Docetaxel, a sua associação ao EGCG possibilitou a indução de maior número de mortes por AI. Como já foi dito são necessárias mais informações/novos ensaios que avaliem outras variáveis, para que se possa clarificar o efeito potenciador do EGCG para estes agentes antineoplásico na linha celular MCF-7.

A citometria de fluxo, como referido na seção 3.7, permite igualmente determinar a fase do ciclo células em que as células se encontram, porém não foi possível realizar esse ensaio devido número reduzido de células viáveis disponíveis. As células MCF-7 são muito sensíveis a pequenas mudanças que possam ocorrer, seja a nível da sua manipulação ou até

mesmo do meio ambiente, o que dificultou a realização de mais experiências que poderiam ser mais conclusivas sobre a ação do composto em termos da indução de morte celular e paragem do ciclo celular – que levaria a uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do EGCG nas células do cancro da mama - MCF-7.

Relacionando estes resultados do tipo de morte celular induzida pela ação das associações CAP+GTE pó, PAX+GTE pó e DOT+GTE pó, com os resultados obtidos em termos da viabilidade celular, para as mesmas associações, verificou-se que para CAP+EGCG a potenciação do efeito da CAP pelo EGCG não está expressa na capacidade de indução da morte celular. Muito provavelmente o EGCG associado à CAP pode estar a interagir com outras vias de sinalização, nomeadamente com o ciclo celular; para PAX+GTE pó a ação sinérgica foi verificada para ambos os ensaios, com aumento da eficácia do PAX relativamente à citotoxicidade e capacidade de indução da morte por AI; para DOT+GTE pó o efeito sinérgico foi observado na viabilidade e na indução da AI, porém sem diferenças estatisticamente significativas em relação à ação isolada do DOT. Assim, é essencial que sejam realizados ensaios para a determinação da fase do ciclo celular, para complementar estes dados de modo a esclarecer possíveis mecanismos de ação do EGCG quando associado aos fármacos.

- Estudos *in vivo*

4.8 Imagens de pequenos animais (ratinhos) com sistema *easyPET*

Após o processo de indução do cancro da mama no modelo de ratinho *nude* (Balb/C *nu/nu*), descrito na seção 3.8 (Estudos *in vivo*), procedeu-se ao estudo imagiológico da evolução da experiência *in vivo*, usando um equipamento especial: *easyPET*, com administração de um radionuclídeo, o ¹⁸F-FDG. O procedimento efetuado para captação das imagens foi descrito na seção 3.9.

A utilização do *easyPET* no decorrer deste trabalho permitiu avaliar o desempenho dessa nova tecnologia quando utilizada *in vivo* o que, por outro lado, foi uma mais-valia para este estudo. O *easyPET* é um meio auxiliar de diagnóstico, uma vez que se espera que com o equipamento se consiga detetar a existência de tumor antes que este seja visível

exteriormente, além de acompanhar a evolução do tumor enquanto o animal está em terapia (ingestão de EGCG de diferentes fontes) e quando já não se vê o tumor por fora.

Os ratinhos injetados com MCF-7 para este ensaio não desenvolveram tumor visível, possivelmente porque por dificuldades de obtenção de células para induzir o tumor foram usados um pouco mais velhos do que o previsto. Alguns apresentavam um pequeno tufo de pêlo, o que pode significar que estavam a desenvolver alguma imunidade (caraterística *nude* reflete a imunodeficiência das células T), como referido na seção 3.8. No entanto, foi possível testar o equipamento com alguns animais. Observando as Figuras 50 e 51 podem analisar-se as imagens adquiridas com o *easyPET*, que comprovam sua capacidade em produzir imagens da atividade metabólica de ratinhos utilizando ^{18}F -FDG. O *software* permitiu trabalhar as imagens adquiridas e apresentar os resultados seccionados em 3 vistas: transversal, coronal e sagital.

Dos testes feitos são apresentados os resultados dois ratinhos fêmea (Figura 50 e 51): um animal injetado com células MCF-7 (protocolo *in vivo*, seção 3.8) sem tumor visível, que comprovou que realmente não havia tumor (Figura 50); uma fêmea injetada com células MCF-7 sem tumor visível mas que mostrou tumor inicial nas imagens (Figura 51).

Na Figura 50 é possível ver a captação do ^{18}F -FDG na região do abdómem e pélvis, com destaque para a bexiga que, como órgão excretor, é o que capta mais. Assim, foi eliminado o sinal da bexiga para que fosse possível identificar outras regiões. A região de maior marcação é o local onde foi injetado o radionuclídeo, o que é normal, além disso há uma captação na região acima do útero, composta principalmente por gordura castanha. Concluiu-se que o ratinho não tinha tumor.

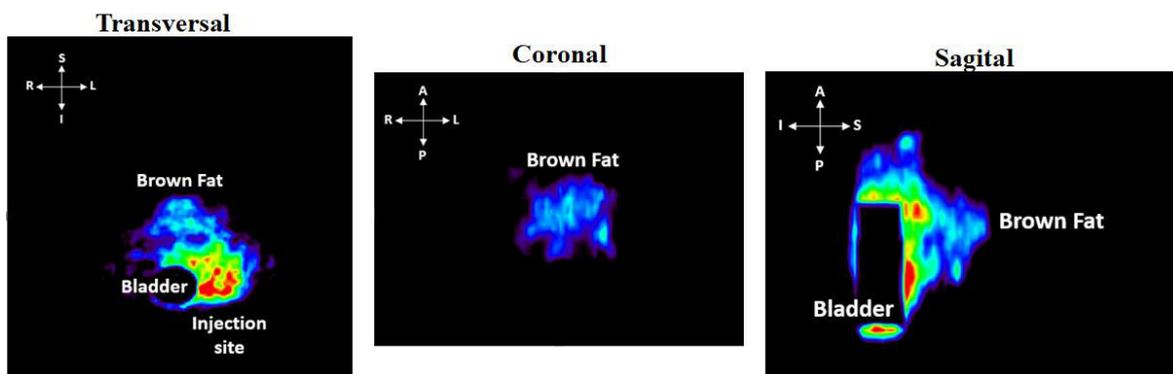


Figura 50 – Ratinho fêmea Balb/C *nude* (identificação: 1d) com $2,8 \times 10^6$ células da linha celular MCF-7 injetadas subcutaneamente a 30/11/17 + injeção de β -estradiol (0,5 a 0,75 mg/ml) uma semana depois, a 7/12/17. Sem tumor visível a olho nu (peso do animal: 20,4 g), no dia 28/03/18 foi efetuado a aquisição de imagem. 1º ^{18}F -FDG injeção intraperitoneal do lado esquerdo, com atividade registada de 680 μCi ; 2º Após 30 minutos injeção intraperitoneal do anestésico no lado direito; 3º 20 minutos depois inicia-se a aquisição por um período de 50 minutos. Na figura observam-se os cortes transversal, coronal e sagital da aquisição feita.

A Figura 51, assim como a Figura 50, mostra uma grande captação do radionuclídeo na bexiga. Novamente a imagem foi filtrada de forma a conseguir mais detalhes das restantes regiões. Eliminando a bexiga destaca-se uma zona de captação que corresponde ao local de inoculação das células tumorais. Apesar de não ser visível exteriormente, o teste demonstrou que o animal desenvolveu um pequeno tumor.

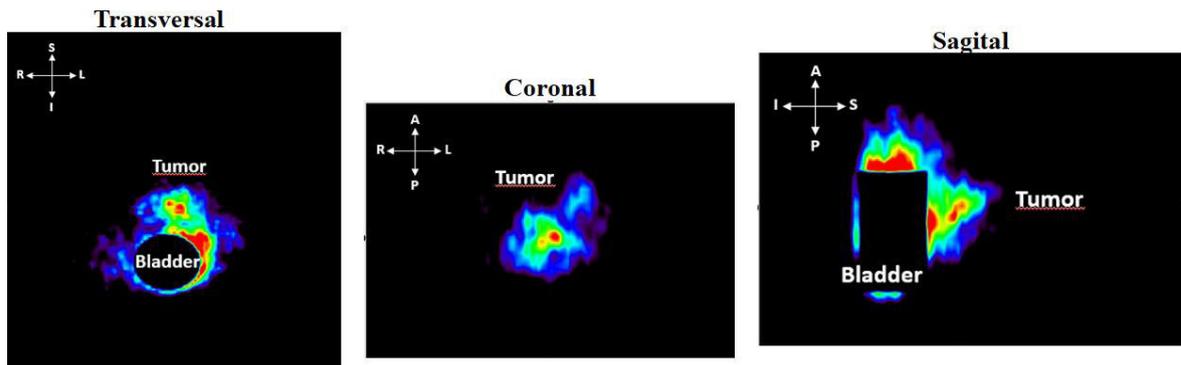


Figura 51 – Ratinho fêmea Balb/C *nude* (identificação: s/f) com $2,8 \times 10^6$ células da linha celular MCF-7 injetadas subcutaneamente a 30/11/17 + injeção de β -estradiol (0,5 a 0,75 mg/ml) uma semana depois, a 7/12/17. Sem tumor visível a olho nu (peso do animal: 23,2 g), no dia 28/03/18 foi efetuada a aquisição de imagem. 1º ^{18}F -FDG injeção intraperitoneal do lado esquerdo, com atividade registada de 470 μCi ; 2º Após 30 minutos injeção intraperitoneal do anestésico no lado direito; 3º 20 minutos depois inicia-se a aquisição por um período de 50 minutos. Na figura observam-se os cortes transversal, coronal e sagital da aquisição feita.

Com base nestes resultados pôde verificar-se que o *easyPET* produzir imagens específicas na deteção de alterações metabólicas usando este radiofármaco, permitindo diagnosticar a presença de uma massa tumoral mesmo antes de esta ser visível exteriormente.

4.9 Estudos histológicos

O objetivo do modelo *in vivo* era verificar se o protocolo de indução de cancro da mama, utilizando células MCF-7, teria êxito em ratos e ratinhos *nudes*. Pretendia acompanhar-se a evolução do modelo usando o equipamento imagiológico *easyPET*.

A eficácia da indução foi baixa, como referido anteriormente, pois no momento da indução os animais eram um pouco mais velhos do que o previsto, isto devido à escassez de células.

Aos animais (ratinhos fêmeas Balb/C *nude*) que desenvolveram tumor foram realizadas análises histológicas, de modo a verificar se o processo de inoculação das células tumorais MCF-7 alterou ou não a morfologia normal dos órgãos colhidos.

Estes animais ficaram pela fase em que apenas só bebiam água porque o tumor não chegou às dimensões pré-definidas para início da terapêutica com chá verde *Lipton*. Os

animais que desenvolveram tumor e começaram a fazer terapêutica (ratos fêmea RNU) ficaram muito desidratados e baixaram o seu peso corporal mais do que 20%, tendo de ser occisados devido às regras de utilização dos animais. O GTE pó que foi administrado a estes animais deveria estar oxidado e eles não beberam a solução. Foi adquirido um novo GTE pó e esta situação resolveu-se, mas os animais não recuperaram o peso em tempo útil.

Foram recolhidas amostras de vários órgãos: glândula mamária, útero, ovário, pulmão, fígado e rim. O estudo histológico foi realizado no laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Dentária da FMUC.

Após a ocisão dos animais, a observação macroscópica já indicava que não haveria alterações histológicas, nos órgãos referidos, o que significa que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais. A histologia comprovou que não houve alterações microscópicas em nenhum dos órgãos analisados (Figuras 52-57). O tumor desenvolvido pelas células MCF-7 injetadas tem a arquitetura típica esperada (Figura 58).

Apesar de se tratar de espécies diferentes (ratinhos/humanos) a analogia relativamente à composição histológica é bem patente. As imagens refletem isso mesmo, sendo possível identificar os componentes estruturais das glândulas mamárias humanas similares às descritas na seção 2.2.1.

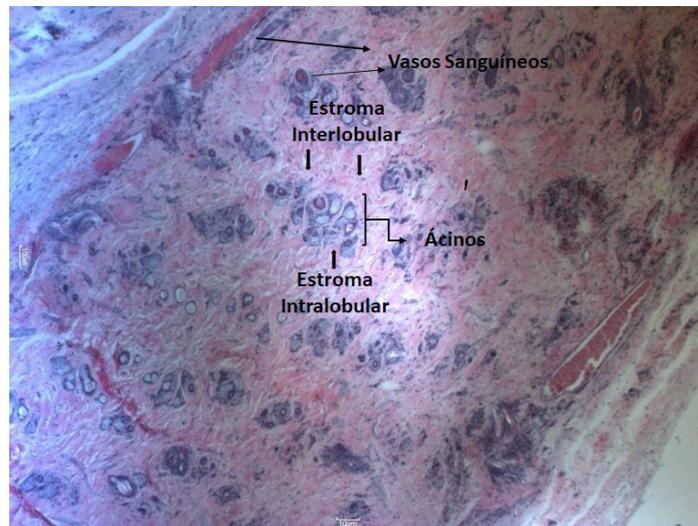


Figura 52 - Exemplo de corte histológico de glândula mamária de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×). É possível identificar ácinos, vasos sanguíneos, estroma intralobular e interlobular. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.



Figura 53 - Exemplo de corte histológico de útero de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar o endométrio, o miométrio e as glândulas uterinas. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.

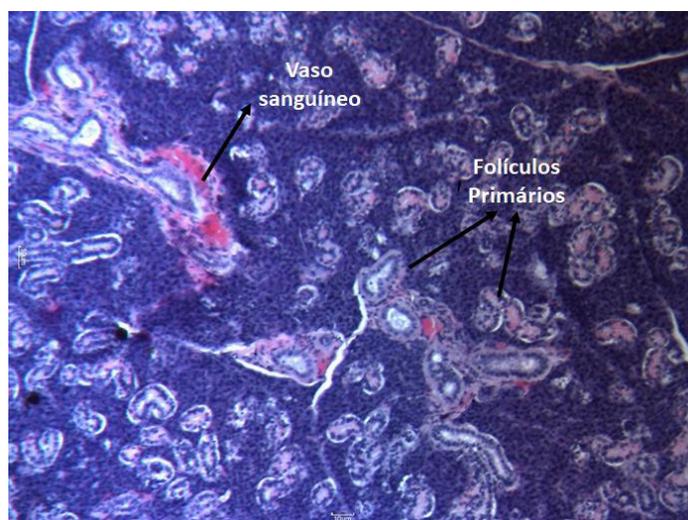


Figura 54 - Exemplo de corte histológico de ovário de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 100×): é possível identificar folículos primários e vasos sanguíneos. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.

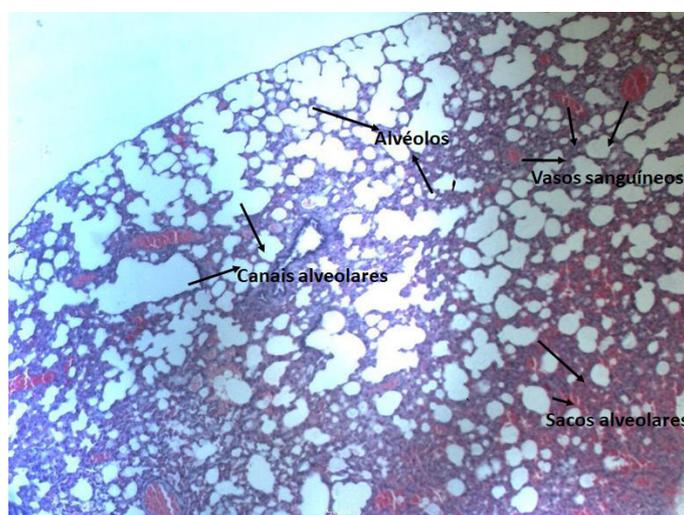


Figura 55 - Exemplo de corte histológico de pulmão de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar canal alveolar, saco alveolar, alvéolos e vasos sanguíneos. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.



Figura 56 - Exemplo de corte histológico de fígado de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 100×): é possível identificar hepatócitos e veias. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.

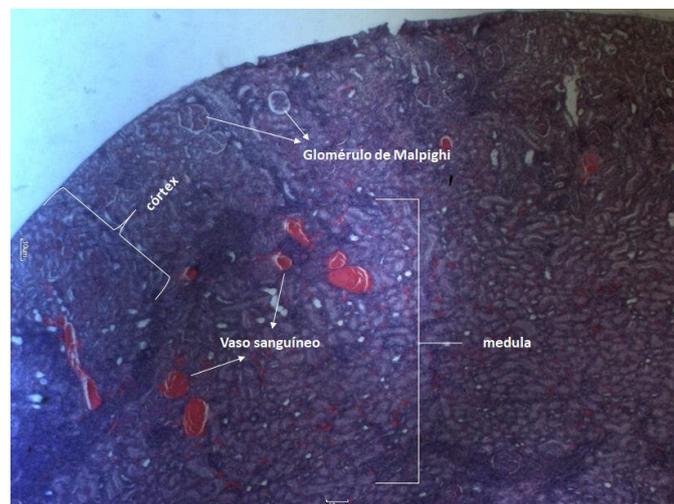


Figura 57 - Exemplo de corte histológico de rim de um ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar o córtex renal, a medula renal, os glomérulos de *Malpighi* e vasos sanguíneos. Histologicamente o órgão é idêntico ao normal, o que revela que o tumor não desenvolveu metástases em nenhum dos animais.

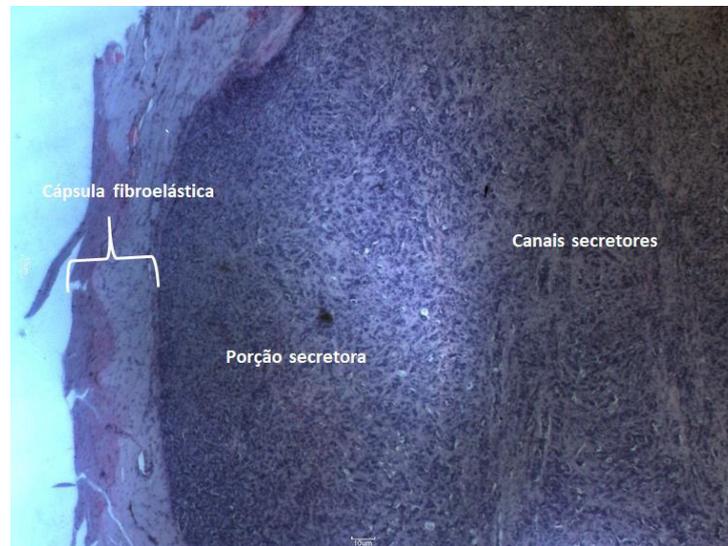


Figura 58 - Exemplos de cortes histológicos de tumor MCF7 de ratinho fêmea observado ao microscópio ótico (ampliação 40×): é possível identificar a cápsula fibroelástica, a porção secretora e o canal da porção secretora. Verifica-se que o tumor é constituído por uma extensa porção secretora, perdendo praticamente todo o tecido conjuntivo interlobular.

Capítulo 5

Conclusões e Perspetivas futuras

No presente estudo foi possível avaliar o papel do EGCG (em doses possíveis de serem reproduzidas no organismo, ou seja, doses fisiológicas) sobre as células da linha celular MCF-7, tanto aplicado isoladamente como em associação a agentes quimioterapêuticos. A avaliação da citotoxicidade e eficácia do EGCG, na inibição do crescimento celular das células em estudo, foi realizada a partir de ensaios utilizando diferentes fontes de EGCG administrados às células.

O primeiro passo foi a determinação do tempo (dias) de incubação necessário para que a sobrevivência celular atingisse 70% do valor médio dos controlos. Foram testados três extratos: o GTEE, MGTE e GTE em pó. Para cada um dos compostos foi determinada uma curva dose-resposta e concluiu-se que, para estes compostos independentemente da concentração, o melhor tempo seria ao fim de 7 dias, ou seja, após realizar 6 aplicações diárias dos compostos. Após esta etapa todos os procedimentos passaram a ser realizados ao longo de 7 dias.

Sabendo o tempo necessário de incubação, foram testados dois regimes de administração dos compostos acima mencionados: modelo de aplicação crónico e o modelo de aplicação aguda. Ambos os modelos mostraram ser eficazes, apresentando valores inferiores a 70% do valor médio dos controlos e, assim sendo, optou-se por seguir o modelo crónico que requer menores consumos e menos tempo despedido para realização do procedimento.

Durante os primeiros procedimentos utilizaram-se quatro concentrações de EGCG (0,5; 1; 5 e 10 µg/ml), pois ainda não se sabia qual a melhor concentração de EGCG para cada um dos compostos, ou seja, qual a concentração mais eficaz para as células MCF-7. Daí foi avaliada a citotoxicidade de cada uma das concentrações e compararam-se os resultados. Para GTEE as concentrações mais citotóxicas para as células MCF-7 foram 1 e 10 µg/ml, mas para MGTE e GTE em pó é indiferente a concentração utilizada, sendo igualmente citotóxicas.

Não só foram utilizados extratos, mas também foram utilizadas infusões de chá verde *Lipton* preparadas com 1, 2 e 3 saquetas, como fontes de EGCG, verificando o seu efeito citotóxico sobre as células MCF-7, com concentrações de 0,5 e 5 µg/ml. Seguindo o mesmo protocolo, 7 dias de experiência (com 6 aplicações diárias de EGCG), no último dia fez-se o ensaio de viabilidade celular. Constatou-se que mesmo com concentrações mais baixas, ou seja 0,5 µg/ml, o chá verde *Lipton* é citotóxico para as células MCF-7 – viabilidade abaixo dos 70% do valor médio dos controlos – sendo o chá verde *Lipton* 2 saquetas o mais citotóxico, com valores abaixo dos 40% do valor médio dos controlos. Para concentrações mais altas verificou-se que o chá verde *Lipton* preparado com 2 e 3 saquetas têm efeito citotóxico semelhante, apresentando valores de viabilidade abaixo dos 30% do valor médio dos controlos. Comprovou-se a eficácia do chá verde *Lipton* relativamente à inibição do crescimento e citotoxicidade para a linha celular do cancro da mama MCF-7.

Além da citotoxicidade do EGCG também foi avaliado o seu possível efeito adjuvante para agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento do cancro da mama. Assim, foram feitas associações, utilizando GTE em pó como fonte de EGCG, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml. Das associações pode verificar-se que:

- para o 5-FU as associações foram visualmente mais citotóxicas que o 5-FU sozinho, porém não foram estatisticamente significativos;
- para a CAP as associações mostraram ser mais citotóxicas que a CAP sozinha;
- para o DOT visualmente as associações pareceram ser mais citotóxicas, mas as diferenças não foram significativas;
- para o PAX a associação com concentração mais alta 5 µg/ml de EGCG foi mais eficaz que o PAX sozinho, já a associação com 0,5 µg/ml foi visualmente melhor que o PAX sozinho, mas a diferença não foi significativa;
- para a DOX as associações pareceram ser mais citotóxicas, porém não existe diferença estatisticamente significativa.

Estes resultados permitiram observar que o EGCG, em doses fisiológicas, pode potenciar o efeito de agentes quimioterapêuticos, mas é necessária a realização de mais ensaios, para que sejam extraídas mais informações sobre o comportamento do EGCG associado a estes fármacos nesta linha celular. Como foi relatado no estado de arte, o EGCG demonstrou potenciar o efeito da maioria destes fármacos noutras linhas celulares, inclusive aquelas que

apresentam fármaco-resistência, mas com doses acima das possíveis de alcançar fisiologicamente. Seria de grande interesse avaliar o efeito quimiossensibilizador do EGCG, em doses fisiológicas, em estudos *in vivo*.

Foi verificado ainda o efeito adjuvante do EGCG, proveniente de outras fontes, associado à Epirrubicina. A Epirrubicina foi associada a GTE em pó, GTEE, EGCG-sigma e ao chá verde *Lipton* preparado com 1, 2 e 3 saquetas, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml. No geral as associações com GTE em pó não aumentaram a citotoxicidade; Associações com GTEE são visualmente mais citotóxicas, mas estatisticamente só a associação com GTEE 5 µg/ml é mais citotóxica que EPI sozinha; Com EGCG-sigma (95% de pureza) a combinação com 0,5 µg/ml foi mais citotóxica que EPI sozinha, demonstrando que o próprio EGCG já tem esse efeito citotóxico. Tratando-se de uma substância com 95% de pureza, não se poderá inferir um sinergismo entre os vários componentes da fonte utilizada; as associações ao chá verde *Lipton* preparado com 1, 2 e 3 saquetas não aumentaram a citotoxicidade. Estes resultados demonstram que o próprio composto EGCG é já capaz de agir sinergicamente com o fármaco em baixas concentrações e que o EGCG proveniente de outras fontes como GTEE também consegue potencializar a citotoxicidade do fármaco. Contudo, como foi referido anteriormente, será necessário aumentar a dimensão das amostras para que o efeito biológico observado seja comprovado como estatisticamente relevante e conseguir dados mais conclusivos sobre este comportamento nesta linha celular.

Outro facto analisado foi se modificações na estrutura dos fármacos interfeririam com o efeito do EGCG. Neste caso comparou-se seu efeito quando associado a dois isómeros: a doxorubicina e a epirrubicina, da família das antraciclina. Concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas, quando associadas ao GTE em pó, sobre as células MCF-7.

Comprovada a citotoxicidade do EGCG, sozinho e associado a agentes quimioterapêuticos para a linha celular MCF-7, procurou determinar-se o tipo de morte que induzia. O tipo de morte celular induzido pela associação fármaco (CAP, PAX e DOT) + GTE em pó, chá verde *Lipton* 2 e 3 saquetas e GTEE, nas concentrações 0,5 e 5 µg/ml, foi determinado efetuando o ensaio, segundo o mesmo protocolo dos estudos em *in vitro* anteriormente realizados. Para a CAP as associações não potenciaram sua capacidade de indução de morte por AI e AT/N, apenas houve uma pequena melhoria a nível no que se refere à indução de necrose. Para o PAX a associação potenciou a sua capacidade de induzir

morte celular por AI (tipo de morte preferencial do paclitaxel), melhorando o desempenho do fármaco. Para o DOT as associações melhoraram a indução de AI, mas são necessários mais dados para determinar o efeito do EGCG no tipo de morte celular e as fases do ciclo celular das células envolvidas. Considerando que os testes de viabilidade realizados anteriormente demonstraram uma melhoria considerável da ação da CAP quando associada ao GTE em pó, o que não se refletiu nos resultados da morte celular, possivelmente, neste caso o EGCG deve agir como um inibidor do ciclo celular, tendo outros mecanismos de ação no combate às células que não puderam ser visualizados. Assim, é de grande importância que sejam realizados ensaios para o ciclo celular, que possam ajudar a esclarecer o mecanismo por trás do efeito potenciador do EGCG.

Adicionalmente foram efetuados estudos em modelos animais de cancro da mama por injeção subcutânea das células MCF-7 em ratinhos *nude* fêmea. A eficácia da indução foi muito baixa, possivelmente devido ao facto de os animais atímicos utilizados serem um pouco mais velhos do que o desejável e puderem estar a adquirir alguma imunidade. Este modelo permitiu testar uma nova tecnologia que está a ser desenvolvida pelo grupo, o *easyPET*. Este equipamento permite acompanhar a evolução do modelo animal, ajudando no diagnóstico, quando ainda não é possível ver o tumor por fora, e, quando já não se vê, se possa detetar se já desapareceu completamente ou não. O *easyPET* mostrou ser capaz de produzir imagens sensíveis e específicas na deteção de alterações metabólicas, ao evidenciar a existência de um tumor num ratinho *nude* fêmea antes que esse fosse visível exteriormente.

Quanto às sugestões de trabalho para o futuro, relativamente aos estudos *in vitro*, como já foi mencionado, é necessário aumentar a dimensão das amostras em estudo de forma a comprovar estatisticamente os efeitos biológicos observados e tidos como relevantes sobre o efeito do EGCG nas células MCF-7.

É crucial a realização da citometria de fluxo para avaliar outros parâmetros que possam ser afetados pela associação destes fármacos ao EGCG e, com outros fármacos indicados para terapêutica do cancro da mama sobre a linha celular MCF-7 – importante para compreender os mecanismos de ação do EGCG nesta linha celular – um ponto de partida para identificar as moléculas alvo e de que forma poderia auxiliar no tratamento deste subtipo de cancro da mama (Luminal A).

Apesar de já terem sido feitos alguns estudos por outros investigadores, seria bom ver o efeito do EGCG proveniente destas fontes na linha celular normal da mama, MCF-10A.

Relativamente aos estudos *in vivo* seria muito interessante realizar a terapêutica dos modelos animais de cancro da mama, pela ingestão do chá verde *Lipton*, quando o tumor atingisse a dimensão de 0,1 cm² para os Balb/C *nude* e 1 cm² para os RNU, um método que pode ser mais facilmente replicado em humanos. Outra vertente de estudos *in vivo* seria a associação de EGCG e fármacos usados na terapia. Desenvolver modelos de cancro da mama com metástases ósseas e avaliar até onde o EGCG pode auxiliar no combate ao cancro é outra possibilidade.

Ainda para os estudos *in vivo* seria bom conseguir acompanhar a sua evolução a nível metabólico com o *easyPET*, mas também ter informação morfológica. Apesar de ter uma grande sensibilidade, a melhoria da resolução espacial não pode ser muito aumentada, e seria uma mais valia conseguir associar os dois tipos de imagem (metabólica e morfológica), melhorando e facilitando a interpretação dos dados adquiridos.

Pretende também realizar-se a análise imuno-histoquímica utilizando marcadores moleculares específicos para avaliação da ação do EGCG em doses fisiológicas na linha celular MCF-7, sozinho e associado a fármacos antineoplásicos utilizados na terapia do cancro da mama. Este estudo permitirá acompanhar a evolução do efeito do EGCG ao longo da terapêutica, através de diferentes vias de sinalização. Sendo a linha MCF-7 do tipo Luminal A, um marcador de interesse seria o dos recetores de estrogénio – para tentar perceber de que modo o EGCG alterará a expressão desses recetores; antigénio CD44 envolvido na proliferação, migração, etc. – que permitiria avaliar o comportamento do tumor frente ao EGCG; marcador Ki67 da proliferação celular; marcador de genes supressores de tumores: *p53* e *p21*; além de marcadores da angiogénese *VEGF*. Seria algo bastante interessante acrescentar uma vez que estudos realizados já verificaram várias vias de sinalização, mas com altas doses de EGCG e fazer estes estudos utilizando doses fisiológicas permitiria extrapolar, com maior precisão, os efeitos do EGCG proveniente do consumo regular do chá verde para o organismo.

Referências bibliográficas

- [1] P. dou, “Green Tea-Proteasome Inhibitor,” vol. 16, no. 5, pp. 208–212, 2012.
- [2] J. Kanwar *et al.*, “Recent advances on tea polyphenols,” *Front. Biosci. (Elite Ed)*., vol. 4, pp. 111–31, 2012.
- [3] S. S. Abd El-Rahman, G. Shehab, and H. Nashaat, “Epigallocatechin-3-Gallate: The Prospective Targeting of Cancer Stem Cells and Preventing Metastasis of Chemically-Induced Mammary Cancer in Rats,” *Am. J. Med. Sci.*, vol. 354, no. 1, pp. 54–63, 2017.
- [4] A. Kazi *et al.*, “Potential molecular targets of tea polyphenols in human tumor cells: significance in cancer prevention,” *In Vivo (Brooklyn)*., 2002.
- [5] Liga Portuguesa Contra o Cancro, “Cancro da mama.” [Online]. Available: <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/>. [Accessed: 15-Jun-2018].
- [6] T. Hsieh and J. M. Wu, “Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and γ -tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells,” *Int. J. Oncol.*, vol. 33, pp. 851–859, 2008.
- [7] Roreno (Registo Oncológico Regional do Norte), “O que é o Cancro?” [Online]. Available: <http://www.roreno.com.pt/pt/sobre-o-cancro/o-que-e-o-cancro.html>. [Accessed: 04-Sep-2018].
- [8] K. Polyak, “Science in medicine Breast cancer : origins and evolution,” *Cell*, vol. 117, no. 11, pp. 3155–63, 2007.
- [9] P. J. Stephens *et al.*, “The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer,” *Nature*, vol. 486, no. 7403, pp. 1–7, 2012.
- [10] M. R. Stratton, P. J. Campbell, and P. A. Futreal, “The cancer genome,” *Nature*, vol. 458, no. 7239, pp. 719–724, 2009.
- [11] J. Bartek, J. Bartkova, and J. Lukas, “DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression,” *Oncogene*, vol. 26, no. 56, pp. 7773–7779, 2007.
- [12] H. C. Pitot, “The molecular biology of carcinogenesis,” *Cancer*, 1993.
- [13] S. B. Baylin and J. E. Ohm, “Epigenetic gene silencing in cancer - A mechanism for early oncogenic pathway addiction?,” *Nature Reviews Cancer*. 2006.
- [14] H. C. Pitot and Y. P. Dragan, “Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis.,” *FASEB J.*, 1991.
- [15] Z. Kleibl and V. N. Kristensen, “Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management,” *Breast*, vol. 28, pp. 136–144, 2016.
- [16] R. R. Seeley, T. D. Stephens, and P. Tate, *Anatomy and Physiology*, 6th ed. 2003.
- [17] H. Ellis, “Anatomy of the breast”, *Women’s Health Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 47-49, 2006.
- [18] Cancer.Net, “Breast Cancer: Introduction,” 2017. [Online]. Available: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/introduction>. [Accessed: 01-Nov-2017].
- [19] J. Stines and H. Tristant, “The normal breast and its variations in mammography,” *Eur. J. Radiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 26–36, 2005.

- [20] American Cancer Society®, “What is breast cancer?” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>. [Accessed: 12-Feb-2018].
- [21] A. L. C. CONCEIÇÃO, “Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásticos através de espalhamento de raios X.” p. Tese de Doutorado., 2008.
- [22] Anatomia Patológica, “Mama normal Lam.A.33.” [Online]. Available: <http://anatpat.unicamp.br/lamgin21.html>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [23] N. Bertos and M. Park, “Breast cancer—one term, many entities?,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 10, pp. 3789–3796, 2011.
- [24] S. K. Yeo and J. L. Guan, “Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor?,” *Trends in Cancer*, vol. 3, no. 11, pp. 753–760, 2017.
- [25] P. T. Simpson, J. S. Reis-Filho, and S. R. Lakhani, “Breast pathology: Beyond morphology,” *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 27, no. 1, pp. 91–96, 2010.
- [26] E. A. Rakha and A. R. Green, “Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know,” *Pathology*, vol. 49, no. 2, pp. 111–119, 2017.
- [27] R. Pare *et al.*, “Breast cancer precursors: diagnostic issues and current understanding on their pathogenesis,” *Pathology*, vol. 45, no. 3, pp. 209–213, 2013.
- [28] G. A. Klevos *et al.*, “A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient,” *J. Radiol. Nurs.*, vol. 36, no. 3, pp. 158–165, 2017.
- [29] A. C. Bateman and E. C. Shaw, “Breast pathology,” *Surg. (United Kingdom)*, vol. 34, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [30] W. B. Coleman and C. K. Anders, “Discerning Clinical Responses in Breast Cancer Based On Molecular Signatures,” *Am. J. Pathol.*, vol. 187, no. 10, pp. 2199–2207, 2017.
- [31] T. Sorlie *et al.*, “Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 14, pp. 8418–8423, 2003.
- [32] P. S. Bernard *et al.*, “Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes,” *J. Clin. Oncol.*, 2009.
- [33] C. M. Perou *et al.*, “Molecular portraits of human breast tumours,” *Nature*, 2000.
- [34] J. D. Brenton *et al.*, “Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application?,” *Journal of Clinical Oncology*. 2005.
- [35] R. Bhargava *et al.*, “Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: A single institutional experience with 359 cases,” *Cancer*, 2010.
- [36] M. E. H. Hammond *et al.*, “American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version),” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2010.
- [37] A. C. Wolff *et al.*, “American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer,” *J. Clin. Oncol.*, 2007.
- [38] H. N. Hilton, C. L. Clarke, and J. D. Graham, “Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 466, pp. 2–14, 2018.

- [39] S. André, A. R. Tomás, and R. Fonseca, “Determinação da amplificação do HER2 por hibridação in situ de fluorescência (FISH),” *Acta Med. Port.*, 2005.
- [40] C. Sotiriou *et al.*, “Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003.
- [41] M. T. Weigel and M. Dowsett, “Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction,” *Endocrine-Related Cancer*. 2010.
- [42] F. Penault-Llorca and N. Radosevic-Robin, “Ki67 assessment in breast cancer: an update,” *Pathology*, vol. 49, no. 2, pp. 166–171, 2017.
- [43] M. C. U. Cheang *et al.*, “Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer,” *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009.
- [44] H. Kennecke *et al.*, “Metastatic behavior of breast cancer subtypes,” *J. Clin. Oncol.*, 2010.
- [45] M. Cianfrocca and L. J. Goldstein, “Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer.,” *Oncologist*, 2004.
- [46] T. Sørlie *et al.*, “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001.
- [47] M. C. U. Cheang *et al.*, “Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype,” *Clin Cancer Res*, 2008.
- [48] W. J. Irvin and L. A. Carey, “What is triple-negative breast cancer?,” *Eur. J. Cancer*, 2008.
- [49] B. Weigelt *et al.*, “Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: A retrospective analysis,” *Lancet Oncol.*, 2010.
- [50] A. Fund, “Cancro da Mama: um guia para o doente. Anticancer Fund,” *Eur. Soc. Med. Oncol.*, 2013.
- [51] J. A. Sparano, “Breast Cancer Staging,” *Medscape*, 2017. [Online]. Available: <https://emedicine.medscape.com/article/2007112-overview>. [Accessed: 20-Dec-2017].
- [52] W. Gradishar *et al.*, “NCCN Guidelines Insights. Breast Cancer, Version 1.2017. Featured Updates to the NCCN Guidelines.,” *Jncn*, vol. 15, no. 4, pp. 433–451, 2017.
- [53] National Cancer Institute, “What You Need to Know About Breast Cancer,” *What You Need To Know About Breast Cancer*, pp. 1–46, 2012.
- [54] MedicineNet.com, “Breast Cancer Diagnosis, Symptoms and Treatment.” [Online]. Available: https://www.medicinenet.com/breast_cancer_pictures_slideshow/article.htm. [Accessed: 20-May-2018].
- [55] BreastCancer.org, “Estadios del cáncer de mama.” [Online]. Available: <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estadios>. [Accessed: 01-Jun-2018].
- [56] C.-Y. Huang *et al.*, “Mechanism of EGCG promoting apoptosis of MCF-7 cell line in human breast cancer,” *Oncol. Lett.*, vol. 14, no. 3, pp. 3623–3627, 2017.
- [57] G. Farshid, *The Normal Breast and Risk Factors for Breast Cancer*. Published by Elsevier Inc., 2014.
- [58] L. A. Torre *et al.*, “Global Cancer Statistics, 2012,” *CA a cancer J. Clin.*, 2015.
- [59] “Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama 09.”, 2007.
- [60] American Cancer Society®, “Treating Breast Cancer.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>. [Accessed: 22-Jun-2018].

- [61] American Cancer Society®, “Treating Breast Cancer.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8581.00.pdf>. [Accessed: 01-Jul-2018].
- [62] American Cancer Society®, “Radiation for Breast Cancer.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/radiation-for-breast-cancer.html>. [Accessed: 22-Jun-2018].
- [63] American Cancer Society®, “Chemotherapy for Breast Cancer.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>. [Accessed: 22-Jun-2018].
- [64] BreastCancer.org, “Quimioterapia.” [Online]. Available: <https://www.breastcancer.org/es/tratamiento/quimioterapia>. [Accessed: 22-Jun-2018].
- [65] BreastCancer.org, “Medicamentos de quimioterapia.” [Online]. Available: <http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/quimioterapia/medicamentos>. [Accessed: 04-Dec-2017].
- [66] American Cancer Society®, “Targeted Therapy for Breast Cancer.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html>. [Accessed: 22-Jun-2018].
- [67] BreastCancer.org, “Terapias dirigidas.” [Online]. Available: https://www.breastcancer.org/es/tratamiento/terapias_dirigidas. [Accessed: 22-Jun-2018].
- [68] Drugs.com, “Paclitaxel Dosege.” [Online]. Available: https://www.drugs.com/dosage/paclitaxel.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [69] Drugs.com, “Docetaxel Dosege.” [Online]. Available: https://www.drugs.com/dosage/docetaxel.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [70] Drugs.com, “Doxorubicin Dosege.” [Online]. Available: https://www.drugs.com/dosage/doxorubicin.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [71] Drugs.com, “Epirubicin Dosege.” [Online]. Available: https://www.drugs.com/dosage/epirubicin.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer___Adjuvant. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [72] Drugs.com, “Fluorouracil Dosege.” [Online]. Available: https://www.drugs.com/dosage/fluorouracil.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [73] Drugs.com, “Capecitabine Dosege.” [Online]. Available: https://www.drugs.com/dosage/capecitabine.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [74] MCF-7 Cells human breast adenocarcinoma cell line, “MCF-7 Cell Information.” [Online]. Available: <http://www.mcf7.com/>. [Accessed: 05-Dec-2017].
- [75] E. Charafe-Jauffret *et al.*, “Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers,” *Oncogene*, vol. 25, no. 15, pp. 2273–2284, 2006.
- [76] H. D. Soule *et al.*, “A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma,” *J. Natl. Cancer Inst.*, 1973.

- [77] A. V. Lee, S. Oesterreich, and N. E. Davidson, "MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 107, no. 7, pp. 1–4, 2015.
- [78] C. K. Osborne and R. Schiff, "Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer," *Annu. Rev. Med.*, vol. 62, no. 1, pp. 233–247, 2011.
- [79] A. J. Casa *et al.*, "Estrogen and insulin-like growth factor-I (IGF-I) independently down-regulate critical repressors of breast cancer growth," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012.
- [80] H. Lewandowska *et al.*, "The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 32, pp. 1–19, 2016.
- [81] V. C. George, G. Dellaire, and H. P. V. Rupasinghe, "Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 45, pp. 1–14, 2017.
- [82] M. Moradzadeh *et al.*, "Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and Telomerase," *Pharmacol. Reports*, vol. 69, no. 5, pp. 924–928, 2017.
- [83] C. S. Yang *et al.*, "Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 6, pp. 1–13, 2010.
- [84] D. Chen *et al.*, "EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment," *Adv. Clin. Chem.*, vol. 53, no. C, pp. 155–177, 2011.
- [85] K. Min and T. K. Kwon, "Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate," *Integr. Med. Res.*, 2014.
- [86] S. M. Chacko *et al.*, "Beneficial effects of green tea: A literature review," *Chin. Med.*, vol. 5, pp. 1–9, 2010.
- [87] Q. P. Dou, "Molecular mechanisms of green tea polyphenols.," *Nutr. Cancer*, 2009.
- [88] T. W. Kwak *et al.*, "Anticancer activities of epigallocatechin-3-gallate against cholangiocarcinoma cells," *Oncotargets. Ther.*, vol. 10, pp. 137–144, 2017.
- [89] K. W. Luo *et al.*, "EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both in vitro and in vivo via down-regulation of NF- κ B and MMP-9," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 41, pp. 56–64, 2017.
- [90] R. Johnson, S. Bryant, and A. L. Huntley, "Green tea and green tea catechin extracts: An overview of the clinical evidence," *Maturitas*. 2012.
- [91] J. D. Lambert and R. J. Elias, "The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention," *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010.
- [92] F. Farabegoli *et al.*, "(-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates estrogen receptor alpha function in MCF-7 breast carcinoma cells," *Cancer Detect. Prev.*, 2007.
- [93] C. Chu *et al.*, "Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [94] M. Shimizu *et al.*, "Preventive effects of (-)-epigallocatechin gallate on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-db/db mice," *Cancer Prev. Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 396–403, 2011.
- [95] S. Shankar, L. Marsh, and R. K. Srivastava, "EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHRL1/FOXO3a and neuropilin," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 372, no. 1–2, pp. 83–94, 2013.

- [96] C. Braicu *et al.*, “Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Inhibits Cell Proliferation and Migratory Behaviour of Triple Negative Breast Cancer Cells,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2013.
- [97] S. K. Mantena, A. M. Roy, and S. K. Katiyar, “Epigallocatechin-3-gallate inhibits photocarcinogenesis through inhibition of angiogenic factors and activation of CD8+ T cells in tumors,” *Photochem. Photobiol.*, 2005.
- [98] C. S. Yang *et al.*, “Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998.
- [99] H. E. Li and C. S. Yang, “Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats,” *Pharmacology*, vol. 25, no. 9, pp. 0–5, 1997.
- [100] R. W. Coppock and M. Dziwenka, “Green Tea Extract,” *Nutraceuticals Effic. Saf. Toxic.*, pp. 633–652, 2016.
- [101] L. Zeng, J. M. P. Holly, and C. M. Perks, “Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 5, no. MAY, pp. 1–10, 2014.
- [102] M. E. Stearns and M. Wang, “Synergistic Effects of the Green Tea Extract Epigallocatechin-3-gallate and Taxane in Eradication of Malignant Human Prostate Tumors,” *Transl. Oncol.*, vol. 4, no. 3, pp. 147–156, 2011.
- [103] S. N. Tang *et al.*, “EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, 2012.
- [104] ATCC, “MCF-7 (ATCC®HTB-22™).” [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/All/HTB-22.aspx#generalinformation>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [105] MCF-7 Cells human breast adenocarcinoma cell line, “MCF-7 Cell Culture.” [Online]. Available: <http://www.mcf7.com/cell-culture/>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [106] ResearchGate, “How to culture MCF-7 cells?” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/post/How_to_culture_MCF7_cells. [Accessed: 03-May-2018].
- [107] Labome The world of laboratories, “Cell Culture Media: A Review.” [Online]. Available: <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [108] Wikipédia, “Glicocálix.” [Online]. Available: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Glicocálix>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [109] ResearchGate, “What is the trypsin mechanism in cell culture?” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/post/What_is_the_trypsin_mechanism_in_cell_culture. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [110] Wikipedia, “Trypsin.” [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [111] ThermoFisher Scientific, “TrypLE™ Express Enzyme (1X), phenol red.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12605028>. [Accessed: 01-Jun-2018].
- [112] F. S. Pereira, “Francisca Sousa Pereira EGCG do chá verde – um agente natural contra o cancro colorretal e cancro da mama,” 2017.

- [113] Sigma-Aldrich, “Cell Quantification.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>. [Accessed: 01-Jun-2018].
- [114] S. E. Collection, “High-Performance Liquid Chromatography (HPLC),” pp. 1–7, 2017.
- [115] T. L. Riss *et al.*, “Cell Viability Assays,” *Assay Guid. Man. [Internet]*, vol. 114, no. 8, pp. 785–796, 2013.
- [116] A. Adan *et al.*, “Flow cytometry: basic principles and applications,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 163–176, 2017.
- [117] R. Francisco and N. Dias, “MINISTÉRIO DA AGRICULTURA , DO MAR , Gabinete da Ministra,” *Diário da República*, pp. 2011–2012, 2012.
- [118] I. Holen *et al.*, “*In vivo* models in breast cancer research: progress, challenges and future directions,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 10, no. 4, pp. 359–371, 2017.
- [119] J. B. Kim, M. J. O’Hare, and R. Stein, “Models of breast cancer: Is merging human and animal models the future?,” *Breast Cancer Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 22–30, 2004.
- [120] Folheto informativo: informação para o utilizador, "Cetamina Hikma 200 mg/20ml solução injetável," Aprovado em 25-10-2012 infarmed, 2012.
- [121] Medikamio, “Largactil IM.” [Online]. Available: <https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/largactil-im/pil>. [Accessed: 08-Sep-2018].
- [122] C. de S. Nunes and L. A. Cinsa, “PRINCÍPIOS DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE ROTINA,” *Rev. Interdiscip. Estud. Exp.*, vol. 8, pp. 31–40, 2016.
- [123] E. Rocha, “Curso de Técnicas Histológicas,” 2016.

Anexos

Anexo I

Declaração ORBEA

Biotério IBILI – Sub-Unidade I – FMUC
ORBEA

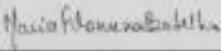
PARECER 17/2015

Título do projeto: PET com sistema inovador de leitura rápida para correção de ODI

Investigador Responsável: João Filipe C. A. Veloso

O Órgão para o Bem Estar Animal – ORBEA, do Biotério IBILI – Sub-Unidade I da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, após análise do projeto acima mencionado, deu o seu parecer favorável.

Coimbra, 24 de Julho de 2015

A Diretora do Estabelecimento	A Veterinária Designada
 _____	 _____

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Pólo II da Universidade de Coimbra | Alameda do Santa Comba, Celis
3000-548 Coimbra, Portugal
Telefone: 239480240 | Fax: 239480258

Anexo II

Declaração DGVA



Assunto: **PROTEÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA FINS EXPERIMENTAIS E/OU OUTROS FINS CIENTÍFICOS – PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJECTO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Na sequência do pedido efetuado por V. Exª no sentido de poder ser autorizada a realização do projeto experimental designado "PET com sistema inovador de leitura rápida para correção de DOI", tendo por investigador responsável o Doutor João Filipe C. A. Veloso, cabe-me informar que o mesmo foi avaliado de acordo com o Artigo 44º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à "proteção dos animais utilizados para fins científicos".

Mais se informa V. Exª que, depois de esclarecidas as dúvidas que a sua análise nos levantou, o projeto em apreço recebeu uma **avaliação favorável** e foi autorizado de acordo com o nº 1, do Artigo 42º do mesmo diploma legislativo.

Com os melhores cumprimentos,

O Diretor Geral,

Fernando Bernardo

DBEA/APM

SEDE : CAMPO GRANDE, 90 – 1700-093 LISBOA - TELEF. 21 323 95 00 FAX. 21 346 26 18