



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

**Estudo comparativo dos efeitos do 17- $\beta$ -estradiol,  
do extracto de soja e dos fitoestrogénios que o  
integram em culturas de células humanas**

**Ana Luísa Baptista Arquilino**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Farmacêuticas**  
(Ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professora Doutora Luíza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro

**Covilhã, Outubro de 2011**

---

---

# Agradecimentos

Durante os últimos meses, várias foram as pessoas que me apoiaram na realização desta dissertação de mestrado, e às quais não posso deixar de agradecer:

*Em primeiro lugar, à Professora Doutora Luíza Granadeiro, minha orientadora, pelo apoio que me proporcionou. O meu muito obrigado pela sua disponibilidade e partilha de conhecimentos;*

*Ao Professor Doutor Miguel Freitas, pelo apoio, acompanhamento e dedicação;*

*Ao Professor Doutor Samuel Silvestre e à Dra. Cristina Ramalinho. A ajuda e companhia no laboratório são sempre bem recebidas;*

*Às colegas de laboratório, Ana Rebelo, Ana Dias, Eduarda, Joana Marques, Márcio e Verónica. O tempo convosco passou rapidamente, e as tarefas a realizar foram sempre mais fáceis;*

*Aos meus pais, avós e à minha irmã Margarida por todo o amor, confiança e apoio incondicional. O incentivo para melhorar a cada dia que passa, e a nunca desistir dos meus sonhos e objectivos, será um lema que ficará guardado para toda a vida;*

*Ao João, por todo o apoio, amizade, carinho, dedicação e disponibilidade, bem como todas as longas conversas e desabafos, que muito me ajudaram, principalmente nas horas menos boas;*

*Agradeço à Sofia e aos pais do João por todo o apoio e amizade;*

*Não poderei deixar de me referir, por fim, a todos os meus amigos e colegas, que nos últimos meses me auxiliaram, e com quem convivi.*

---

---

# Resumo

A soja tem vindo a adquirir uma posição de destaque no mercado ocidental, ao longo dos últimos anos, com o aumento da procura por este produto vegetal. Os fitoestrogénios são importantes constituintes da soja que se ligam a receptores de estrogénio (ER), podendo exercer alguns efeitos benéficos no Homem. A acção anticarcinogénica, a diminuição de alguns sintomas associados à menopausa, e a prevenção da osteoporose e das doenças cardiovasculares são alguns dos resultados positivos já evidenciados. Os fitoestrogénios mais estudados são as isoflavonas, onde se insere a genisteína e a daidzeína.

Os estudos realizados pretenderam estudar qual o efeito de diferentes concentrações dos compostos estrogénicos (extracto de soja, genisteína, daidzeína e 17- $\beta$ -estradiol) em fibroblastos saudáveis da derme humana- NHDF e células epiteliais com carcinoma mamário-MCF7. Para alcançar este objectivo, optimizou-se o modelo de estudo, determinaram-se os efeitos na viabilidade celular após incubação e recuperação (ensaio de MTT), e estudou-se a capacidade de induzir a apoptose (ensaios de citometria de fluxo).

Dos vários protocolos testados na optimização do modelo de estudo, foi escolhido o protocolo que se baseou na aplicação de meio de cultura completo, e que usou tempos de incubação e recuperação de 48 horas. Observou-se uma variação na viabilidade celular dependente da concentração aplicada, tendo as concentrações mais elevadas demonstrado uma diminuição estatisticamente significativa da mesma, para as linhas celulares NHDF e MCF7. Registou-se uma recuperação nas 2 linhas celulares, que foi superior nas MCF7. Os ensaios de citometria de fluxo indicaram que os compostos estudados poderiam exercer uma acção protectora sobre as células, no entanto, o número de ensaios realizados não foi suficiente para podermos tirar conclusões. Por fim, foram comparadas diluições semelhantes de 1 cápsula de extracto de soja e de um comprimido de 17- $\beta$ -estradiol, aconselhados na terapia hormonal de substituição. Concluiu-se que a recomendação da administração do extracto de soja deve ser cuidadosamente avaliada, pois pode aumentar a proliferação celular em tecidos cancerígenos.

## Palavras-chave

Extracto de soja, 17- $\beta$ -estradiol, daidzeína, genisteína, NHDF, MCF7, Terapia Hormonal de Substituição

---

---

# Abstract

Over the past years, soy has gained a prominent position in the Western market, with the increasing demand and supply for this plant. Phytoestrogens are important constituents of soy. They bind to estrogen receptors (ER) and they are able to modify some physiological processes, with benefits for humans. The anticarcinogenic action, the reduction of some symptoms associated with menopause, and prevention of osteoporosis and cardiovascular diseases are some of the positive outcomes. The most studied phytoestrogens are isoflavones, which include genistein and daidzein.

The studies conducted sought to investigate the effect of different concentrations of estrogenic compounds (a soy extract, genistein, daidzein and 17- $\beta$ -estradiol) in human dermal fibroblasts from healthy subjects - NHDF - and epithelial breast carcinoma cells - MCF7. To achieve the objectives, it was necessary to optimize the model of study, to determine the effects on cells viability: after incubation and after recovery (MTT assay), and to study the capacity of the induction of apoptosis (flow cytometry assays).

We tested different protocols, in the process of optimization of the model of study. The chosen protocol was based on the application of complete culture medium, and incubation and cells recovery's time was 48 hours. We checked a variation in cells' viability, that was concentration-dependent; the results for the highest concentration applied showed a statistically significant decrease in cells viability for the MCF7 and NHDF cell lines. Both cell lines recovered, but MCF-7 cells recovered more. The flow cytometry assays indicated that the compounds studied may exert a protective action on cells, however, the number of tests developed in our studies was not enough to draw conclusions. Finally, we compared a soybean extract (capsules) and 17- $\beta$ -estradiol (tablets), used on hormone replacement therapy. We concluded that the recommendations about administering supplements or medicines based on soybean extracts must be carefully evaluated, as it may increase cell proliferation in cancer tissues.

## Keywords

Soy extract, 17- $\beta$ -estradiol, daidzein, genistein, NHDF, MCF7, Hormonal Replacement Therapy

---

---

# Índice

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. O consumo de produtos naturais à base de plantas .....	1
2. Soja ( <i>Glycine max</i> ) .....	3
2.1. Caracterização da soja .....	3
2.2. Diferenças no tratamento da soja .....	4
2.3. Principais constituintes da semente de soja .....	4
2.3.1. Macronutrientes.....	4
2.3.2. Micronutrientes .....	5
2.4. Efeitos da soja e suas aplicações .....	6
3. Fitoestrogénios.....	9
3.1. Os fitoestrogénios como constituintes da semente de soja .....	9
3.2. Isoflavonas da soja .....	11
3.2.1. Genisteína.....	11
3.2.2. Daidzeína .....	13
3.3. Metabolismo das isoflavonas.....	13
3.4. Outros mecanismos de acção dos fitoestrogénios.....	16
4. Estrogénios.....	17
4.1. Recursos endógenos de estrogénios .....	17
4.2. Síntese de estrogénios .....	18
4.3. Transporte e Metabolismo dos estrogénios .....	20
4.4. Receptores de estrogénios .....	21
4.5. Mecanismo de acção dos estrogénios .....	22
4.5.1. Mecanismos de acção genómica.....	22
4.5.2. Mecanismos de acção não genómica ou extranuclear .....	23
5. Cultura de células: Modelo experimental para o estudo de compostos estrogénicos .....	25
<b>Objectivos</b> .....	<b>27</b>

---

<b>Material e Metodologia</b> .....	<b>29</b>
1. Material .....	29
1.1. Reagentes .....	29
1.2. Compostos testados nas células humanas .....	29
1.3. Instrumentação .....	30
2. Preparação dos compostos utilizados .....	30
2.1. Preparação do extracto de soja comercial (180mg/cápsula) .....	30
2.2. Isoflavonas da soja .....	31
2.3. 17- $\beta$ -Estradiol .....	32
2.4. Preparação do 17- $\beta$ -Estradiol comercial (2 mg/comprimido).....	32
3. Linhas celulares.....	33
3.1. MCF7 .....	33
3.2. NHDF .....	33
4. Preparação dos meios de cultura utilizados na cultura de células .....	34
4.1. RPMI (meio de cultura utilizado na linha celular NHDF).....	34
4.2. DMEM (meio de cultura utilizado nas MCF7) .....	34
5. Técnicas aplicadas .....	35
5.1. Tripsinização .....	35
5.2. Armazenamento das células .....	35
5.3. Contagem das células.....	36
6. Testes realizados para analisar a viabilidade celular e a morte celular em culturas de células <i>in vitro</i> .....	36
6.1. Ensaio MTT .....	36
6.2. Citometria de fluxo - Ensaios de marcação de apoptose e morte celular	37
7. Procedimento geral realizado para estudar o efeito dos compostos 17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja e fitoestrogénios da soja na viabilidade celular e na indução da morte celular .....	39
7.1. Estudo de viabilidade celular.....	39
7.2. Estudo de marcação da apoptose e da morte celular.....	41
8. Justificação das concentrações aplicadas nos ensaios .....	42
9. Análise estatística .....	43

---

<b>Escolha e optimização do protocolo experimental.....</b>	<b>45</b>
1. Constituição do meio de cultura .....	45
2. Determinação dos intervalos de tempo ideais para incubação com os compostos e na recuperação .....	49
<b>Resultados experimentais e discussão .....</b>	<b>53</b>
1. Estudos de viabilidade celular .....	53
1.1. Estudos nas células NHDF .....	53
Comparação da viabilidade celular obtida com o extracto de soja e a daidzeína em NHDF .....	57
1.2. Estudos nas células MCF7.....	59
Comparação entre Extracto de Soja e daidzeína em MCF7 .....	61
1.3. Comparação dos efeitos do 17- $\beta$ -estradiol, do extracto de soja e dos fitoestrogénios da soja (genisteína e daidzeína) em NHDF e MCF7 .....	64
2. Estudos preliminares da marcação da apoptose (Citometria de Fluxo).....	67
2.1. Fibroblastos da derme humana - NHDF .....	67
2.2. Células epiteliais MCF7 .....	69
2.3. Comparação dos resultados obtidos relativos à indução de apoptose e morte celular para MCF7 e NHDF .....	71
3. Análise comparativa entre os estudos de viabilidade celular (MTT) e os estudos de marcação de apoptose (Citometria de Fluxo) .....	73
3.1. Fibroblastos saudáveis NHDF .....	73
3.2. Células epiteliais cancerígenas MCF7 .....	74
4. Comparação entre a resposta das células NHDF e MCF7 aos compostos comerciais aplicados em terapia hormonal de substituição: Estudo preliminar .	75
4.1. Comparação entre Extracto de Soja e THS em NHDF .....	75
4.2. Comparação entre Extracto de Soja e THS em MCF7.....	76
4.3. Comparação entre o 17- $\beta$ -estradiol comercial (THS) e o Extracto de soja em MCF7 e em NHDF .....	77
<b>Conclusões.....</b>	<b>79</b>
<b>Perspectivas futuras.....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>83</b>

---

---

---

# Lista de Figuras

Figura 1- Planta da soja.

Figura 2- Comparação das estruturas moleculares dos fitoestrogénios e do estradiol.

Figura 3- Metabolismo das isoflavonas.

Figura 4- Conversão da biochanina A em genisteína e da formonectina em daidzeína.

Figura 5- Estrutura química do 17- $\beta$ -estradiol.

Figura 6- Síntese dos estrogénios.

Figura 7- Síntese ovariana, transporte e metabolismo dos estrogénios.

Figura 8- Mecanismos de acção do estrogénio.

Figura 9- Caracterização do extracto de soja.

Figura 10- Conversão do sal tetrazolium MTT em formazano (produto corado) pela acção da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase.

Figura 11- Disposição dos compostos Genisteína e 17- $\beta$ -estradiol numa placa *multiwells* de 24 pocetos.

Figura 12- Disposição dos compostos Extracto de Soja e Daizeína aplicados na placa *multiwells* de 24 pocetos.

Figura 13- Disposição diferentes diluições de 17- $\beta$ -estradiol comercial usado na terapia hormonal de substituição, na placa *multiwells* de 24 pocetos.

Figura 14- Gráficos representativos dos resultados obtidos na aplicação dos protocolos 1, 2 e 3 para os ensaios controlo (compostos de interesse ausentes). Gráfico da esquerda: Viabilidade celular relativa observada às 48 horas (48H) *versus* viabilidade celular relativa observada após recuperação (CREC) para cada um dos protocolos estudados. Gráfico da direita: Representação gráfica das diferenças observadas no gráfico da esquerda.

Figura 15- Representação gráfica das diferenças entre viabilidade celular relativa, após recuperação e após 48 h de incubação com os compostos de interesse, aplicando os protocolos em estudo. Os valores assinalados com \* apresentam diferenças significativas relativamente aos resultados obtidos pelo ensaio controlo, obtidas através da aplicação da teoria matemática explicitada no “Material e Metodologia” (Ponto 9- Análise Estatística).

---

Figura 16- Os gráficos da esquerda mostram os resultados obtidos para a viabilidade celular relativa após 48 e 96 horas de incubação. Os gráficos da direita mostram os resultados obtidos para a recuperação celular de 48H e de 96H (CREC).

Figura 17- Gráficos dos efeitos do 17- $\beta$ -estradiol, do extracto de soja e dos fitoestrogénios (genisteína e daidzeína) na linha celular NHDF. Os efeitos estudados foram a viabilidade celular relativa: após 48 horas (48H) de incubação com os compostos e após recuperação (CREC). \* - Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa para o controlo e um determinado composto, após 48 de incubação - aplicação do teste estatístico t-student ( $p < 0,05$ ).

Figura 18- Representação gráfica da percentagem de recuperação celular para as NHDF. As colunas assinaladas com \* apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo. Aplicação da teoria matemática explicitada no “Material e Metodologia” (Ponto 9- Análise Estatística).

Figura 19- Gráficos dos efeitos do 17- $\beta$ -estradiol, do extracto de soja, dos fitoestrogénios (genisteína e daidzeína) na linha celular MCF7. Os efeitos estudados foram a viabilidade celular relativa: após 48 horas (48H) de incubação com os compostos e após recuperação (CREC). \* - Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação - aplicação do teste t-student ( $p < 0,05$ ).

Figura 20- Representação gráfica da percentagem de recuperação celular para as MCF7. As colunas assinaladas com \* apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo. Aplicação da teoria matemática explicitada no “Material e Metodologia” (Ponto 9- Análise Estatística).

Figura 21- Gráficos representativos das viabilidades celulares relativas para 48h de incubação com os compostos de interesse (48H) e após recuperação (CREC) para as 2 linhas celulares testadas (NHDF e MCF7).

Figura 22 - Razões de recuperação para as 2 linhas celulares (NHDF e MCF7), após 48 horas de incubação com os compostos em estudo e após recuperação.

Figura 23- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células NHDF (controlo, extracto de soja e 17- $\beta$ -estradiol).

Figura 24- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células NHDF (genisteína e daidzeína).

Figura 25- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células MCF7 (controlo, extracto de soja e 17- $\beta$ -estradiol).

---

Figura 26- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células NHDF (genisteína e daidzeína).

Figura 27- Gráficos comparativos das percentagens de morte celular (necrose) e apoptose inicial em NHDF e MCF7, aplicando concentrações intermédias dos compostos.

---

---

# Lista de Gráficos

Gráfico 1- Comparação da influência na viabilidade celular de concentrações análogas de extracto de soja e de daidzeína. As concentrações equivalentes estão referenciadas na tabela anterior. 48H- incubação durante 48h. CREC- Recuperação celular com meio de cultura. B- Concentração mais baixa; A- Concentração mais elevada.

Gráfico 2- Comparação da influência na viabilidade celular de concentrações análogas de extracto de soja e de daidzeína. As concentrações equivalentes estão referenciadas na tabela 8. 48H- incubação durante 48 horas; CREC- Recuperação celular com meio de cultura; B- Concentração mais diluída; A- Concentração mais concentrada.

Gráfico 3- Valores de viabilidade celulares relativas após incubação e recuperação, para a linha celular NHDF.

Gráfico 4- Percentagens de apoptose inicial e de morte celular (necrose) obtidas após incubação com os compostos, para a linha celular NHDF.

Gráfico 5- Valores de viabilidade celulares relativas após incubação e recuperação, para a linha celular MCF7.

Gráfico 6 - Percentagens de apoptose inicial e de morte celular (necrose) obtidas após incubação com os compostos para as MCF7.

Gráfico 7- Valores de viabilidade celulares relativas após incubação (48H) e recuperação (CREC), para a linha celular NHDF.

Gráfico 8- Percentagens de apoptose inicial e de morte celular (necrose) obtidas após incubação com os compostos, para a linha celular NHDF.

Gráfico 9- Valores de viabilidade celulares relativas após incubação (48H) e recuperação (CREC), para a linha celular MCF7.

Gráfico 10 - Percentagens de apoptose inicial e de morte celular (necrose) obtidas após incubação com os compostos para as MCF7.

Gráfico 11- Representação da viabilidade celular obtida após 48horas de incubação, com as mesmas diluições de 1 comprimido de 17-B-estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de Soja, e após recuperação, para NHDF.

---

Gráfico 12- Representação da viabilidade celular obtida após 48 horas de incubação, com as mesmas diluições de 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de Soja, e após recuperação, para MCF7.

Gráfico 13- Comparação da viabilidade celular após incubação (48H) e após recuperação (CREC) para as mesmas diluições de 1 cápsula de extracto de soja e para 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS), nas linhas celulares MCF7 e NHDF.

---

# Lista de Tabelas

Tabela 1- Concentrações das diluições de extracto de soja preparadas e concentrações aplicadas nas culturas celulares.

Tabela 2- Concentrações das diluições da preparação comercial de 17- $\beta$ -estradiol usada na terapia hormonal de substituição aplicadas nas culturas celulares.

Tabela 3- Interpretação dos resultados da citometria de fluxo.

Tabela 4- Concentrações dos compostos de interesse, aplicadas na análise por citometria de fluxo.

Tabela 5- Equivalência de concentrações para os compostos comerciais testados.

Tabela 6- Análise dos resultados obtidos para os tempos de incubação e recuperação às 48 e 96 horas, Aplicação do teste *t-student* ( $p < 0,05$ ); são consideradas diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (S)

Tabela 7- Resumo dos resultados obtidos nas células NHDF após 48 horas de incubação com os compostos estudados. Aplicação do teste *t-student* para análise estatística; são consideradas diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (S).

Tabela 8- Equivalências entre as concentrações de extracto de soja e de daidzeína.

Tabela 9- Comparação das respostas obtidas pela daidzeína e pelo extracto de soja em NHDF, através da análise estatística, usando o teste *t-student* ( $p < 0,05$ ).

Tabela 10- Resumo dos resultados obtidos nas células MCF7 após 48 horas de incubação com os compostos estudados. Aplicação do teste *t-student* para análise estatística dos resultados; são consideradas diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (S).

Tabela 11- Comparação das respostas obtidas pela daidzeína e pelo extracto de soja para as MCF7 através da análise estatística, usando o teste *t-student* ( $p < 0,05$ ).

Tabela 12- Análise estatística comparativa entre as respostas obtidas em NHDF e em MCF7 após incubação com os compostos de interesse e após recuperação com meio de cultura. Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

---

Tabela 13- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos para diversas diluições de 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de soja após 48 horas de incubação nas células NHDF (THS vs Soja 48h). Comparação dos resultados obtidos após recuperação (THS vs Soja CREC). Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 14- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos para diversas diluições de 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de soja após 48 horas de incubação nas células NHDF (THS vs Soja 48h). Comparação dos resultados obtidos após recuperação (THS vs Soja CREC). Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 15- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos após 48 horas de incubação com os 2 compostos, nas células MCF7 e NHDF. Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 16- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos após recuperação, nas células MCF7 e NHDF. Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

---

# Lista de Acrónimos

17-β-HSD	Desidrogenase 17- β-Hidroxiesteróide
48H	48 horas de incubação
96H	96 horas de incubação
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP-1	Proteína- Activadora 1
ATCC	American Type Culture collection
AVC	Acidente Vascular Cerebral
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CICS	Centro de investigação em Ciências da saúde
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COMT	Catecol O-metiltransferase
CREC	Com recuperação
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilssulfóxido
E1	Estrona
E2	17-β-estradiol
E3	Estriol
ER	Receptor de estrogénio
ER $\alpha$	Receptor de estrogénio $\alpha$
ER $\beta$	Receptor de estrogénio $\beta$
ERE	Elementos de resposta aos estrogénios
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína
GFR	Growth Factor Receptor
GPR30	Receptor de estrogénio acoplado à proteína G
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
HSP-90	<i>Heat-shock protein- 90</i>
MAPK	Proteína cinase activada por mitogénio
MCF7	Linha celular de adenocarcinoma mamário (Michigan Cancer Foundation-7)
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NF $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
NHDF	<i>Neutral Human Dermal Fibroblasts</i>
O-DMA	O-desmetilangolensina
PBS	Tampão fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PSA	Antigénio específico da próstata
PTK	Proteína Tirosina Cinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute- Meio de cultura NHDF
rpm	Rotações por minuto
SP-1	Proteína Estimuladora-1
THS	Terapia Hormonal de Substituição

---

---

# Introdução

## 1. O consumo de produtos naturais à base de plantas

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde os primórdios da história da humanidade e são, ainda, a base dos cuidados de saúde em várias zonas do mundo. Nas últimas décadas registou-se um aumento crescente na comercialização de produtos de origem natural à base de plantas, em vários países (van Duursen et al., 2011). Estes são consumidos por cerca de um terço dos adultos dos países ocidentais, sendo frequentemente usadas como complementos à medicina alopática. A possibilidade de auto-administração, aliada à consciencialização colectiva de que as plantas são seguras e não provocam toxicidade devido à sua origem natural, está, em parte, na origem de tal crescimento no consumo (Pugi et al., 2011; Zhou et al., 2004).

As plantas são misturas químicas complexas, compostas por centenas de constituintes, e o efeito terapêutico destes não está, por vezes, bem estudado e compreendido. A eficácia e a segurança frequentemente não comprovadas, e a falta de informação acerca dos efeitos adversos, devido à escassez de ensaios clínicos controlados e randomizados, é um problema associado a estes produtos (Barnes, 2003b).

Os fitoterapêuticos podem ser obtidos a partir da totalidade da planta, ou de partes específicas da mesma (folhas, frutos sementes ou raízes). Os extractos alcoólicos, os óleos essenciais, e outros componentes extraídos das plantas, podem ser comercializados sob a forma de comprimidos, cápsulas, infusões, tinturas ou outras formulações galénicas, e estão frequentemente disponíveis para serem dispensados sem prescrição médica (Barnes, 2003a).

Alguns compostos de origem vegetal são já conhecidos e estão bem documentados, contudo a heterogenicidade das preparações fitoterápicas não permite, frequentemente, conhecer todos os compostos existentes, pelas seguintes razões:

- Apresentam um elevado espectro de substâncias activas desconhecidas, que podem contribuir para o efeito terapêutico pretendido, mas também para a toxicidade;
- O perfil de constituintes não é uniforme em todas as partes da planta;
- A quantidade de constituintes varia de planta para planta, dentro da mesma espécie;
- Os factores ambientais, a colheita, o armazenamento e a secagem influenciam a quantidade de constituintes e a sua qualidade (Ernst, 2005).

---

Contudo, os produtos derivados de plantas continuam a ser muito utilizados pelos consumidores, podendo ser adquiridos em diversos locais, tais como supermercados, lojas de produtos naturais ou através da internet (Barnes, 2003b). É necessário alertar as populações para a necessidade de obterem informação cientificamente comprovada antes de iniciarem o consumo. Os profissionais de saúde, nomeadamente o farmacêutico, têm um papel cada vez mais importante na avaliação da segurança, eficácia e efectividade dos produtos naturais, aconselhando os pacientes acerca da sua utilização apropriada (Barnes, 2003a).

Uma das plantas que tem vindo a adquirir uma posição de destaque no mercado ocidental, principalmente pelo seu volume de vendas, e consequente consumo, é a soja (Patisaul & Jefferson, 2010). Em Portugal, a procura e a oferta desta planta no mercado têm aumentado. Segundo um estudo da Associação Portuguesa de Dietistas, cerca de 1.300.000 portugueses introduziram-na na sua dieta alimentar (APD, 2011).

---

## 2. Soja (*Glycine max*)

### 2.1. Caracterização da soja

A soja é uma planta herbácea pertencente à ordem Rosaceae. Pode enquadrar-se em várias famílias: Fabaceae, Papilionaceae ou Leguminosae. Pertence à subfamília Papilionoidae, ao género *Glycine* e à espécie *Glycine max* (Allred et al., 2004; Mateos-Aparicio et al., 2008).

As folhas tripartidas desta planta são características. O fruto apresenta-se na forma de uma vagem que contém, no seu interior, grãos de forma oval. A altura da planta pode variar entre 20 centímetros e 2 metros (Cederroth & Nef, 2009).



Figura 1- Planta da soja (Co-Extra, 2008).

Acredita-se que a soja teve origem na China, há cerca de 5000 anos. Engelbert Kaempfer foi o responsável por, em 1712, introduzir a espécie no continente europeu, mas as condições climatéricas e o solo inapropriado impediram que esta se tornasse uma planta de cultivo corrente. Posteriormente foi Carl von Linné que nomeou a soja de *Glycine max* (Cederroth & Nef, 2009; Mateos-Aparicio et al., 2008).

A parte da planta mais usada é a semente, e actualmente existem mais de 2500 variedades, muitas delas geneticamente modificadas. A semente de soja é a matéria-prima utilizada em vários produtos, nomeadamente em leite de soja, queijo, tofu, e outros produtos de fermentação (Patisaul & Jefferson, 2010).

---

## 2.2. Diferenças no tratamento da soja

Nos países asiáticos, as sementes de soja não são frequentemente processadas; não sofrem processos de extracção, purificação, nem são cozinhadas (Kim et al., 2008).

Pelo contrário, nos Estados Unidos da América, as sementes de soja são altamente processadas; atravessam vários processos modificadores, antes de chegarem ao consumidor final. As indústrias de suplementos alimentares e dietéticos fabricam produtos derivados da soja, tais como isolados de proteínas (80-90% de proteína) e produtos enriquecidos com isoflavonas (40-70% de isoflavonas). Estes perdem alguns dos seus componentes activos biologicamente favoráveis, e não apresentam os mesmos benefícios para a saúde que os consumidos nos países asiáticos (Allred et al., 2004; Kim et al., 2008).

## 2.3. Principais constituintes da semente de soja

A semente de soja apresenta diversas particularidades em relação aos seus constituintes. É um aditivo alimentar muito popular pelos seguintes motivos:

- Não apresenta colesterol na sua constituição,
- Tem proteínas vegetais ricas em hidratos de carbono complexos e lípidos insaturados,
- Possui altos teores de fibras,
- Não contém lactose (Patisaul & Jefferson, 2010).

Por outro lado, também exibe capacidade para formar géis, emulsões e espumas, tornando a semente de soja um importante aditivo em vários processos industriais (Garcia et al., 1997).

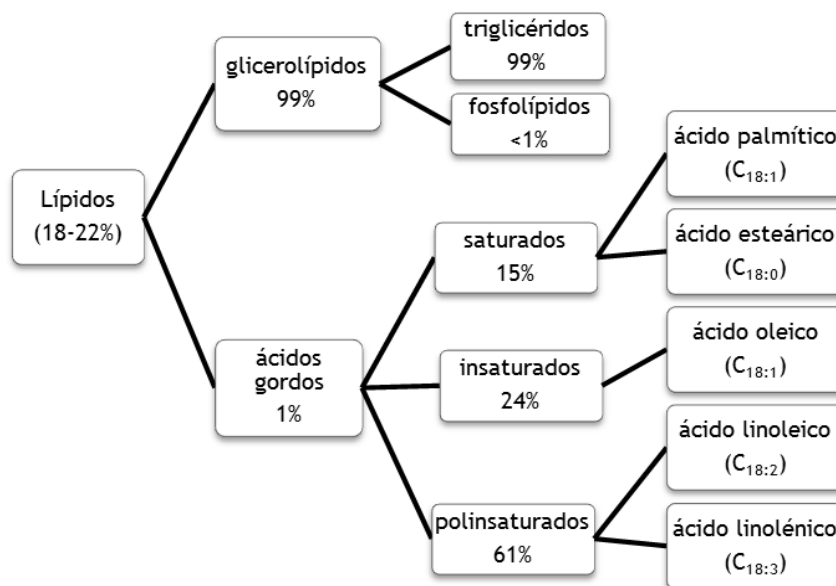
É constituída por macronutrientes essenciais ao ser humano, tais como as proteínas, glícidos e lípidos e por micronutrientes, nos quais podemos incluir as isoflavonas, as vitaminas, as saponinas e os minerais. (Cederroth & Nef, 2009)

### 1. Macronutrientes

A semente de soja é uma importante fonte de proteínas, que variam entre 36% a 46% do total de componentes da planta. Apresenta níveis reduzidos de aminoácidos sulfurados, entre os quais a metionina, a cistina e a treonina. No entanto, apresenta quantidades elevadas de lisina. Os cereais pouco ricos neste aminoácido são, em várias ocasiões, suplementados com soja, com o intuito de se tornarem mais nutritivos (Allred et al., 2004; Mateos-Aparicio et al., 2008).

As proteínas transportadoras são uma parte considerável do total de proteínas da semente de soja. Entre estas, encontram-se as globulinas 7S ( $\beta$ -conglucina) e 11S (glicina), que representam cerca de 80% do conteúdo proteico total. As menos abundantes são a globulina 2S, 9S e 15S. Outras proteínas, tais como enzimas, inibidores da proteinase e lectina também estão presentes. As proteínas da soja podem interagir com minerais, ácido ascórbico e com as fibras (Cederroth & Nef, 2009; Garcia et al., 1997).

As sementes de soja são constituídas por 18-22% de lípidos. No esquema seguinte está representado o seu conteúdo lipídico. O ácido gordo mais predominante é o ácido linoleico, que representa 53% do conteúdo total de ácidos gordos da soja (Cederroth & Nef, 2009; Jian, 2009).



Esquema 1- Conteúdo em lípidos da semente de soja.

Os hidratos de carbono correspondem a 30% dos compostos da semente de soja. Dividem-se em solúveis, tais como a sacarose, que equivalem a 50% dos glúcidos, e em insolúveis (os restantes 50%), tais como a celulose, a hemicelulose e a pectina, ou seja, as fibras (Cederroth & Nef, 2009).

## 2. Micronutrientes

Vários minerais constituem a semente de soja, tais como o ferro (4,42 mg/90g de semente de soja), zinco (0,99 mg/90g de semente de soja) e o cálcio (138mg/90g de semente de soja)(Garcia et al., 1997). As saponinas, vitaminas e fitoestrogénios, nomeadamente as isoflavonas genisteína e a daidzeína, são outros dos micronutrientes da soja. As isoflavonas são os componentes mais relevantes e mais estudados da semente de soja (Cederroth & Nef, 2009; Kwack et al., 2009).

---

## 2.4. Efeitos da soja e suas aplicações

O conhecimento da acção da soja no organismo gera-se principalmente através de estudos clínicos e epidemiológicos. Estes avaliam a relação entre o consumo de fitoestrogénios da soja e situações clínicas concretas. As doses utilizadas pelos humanos, e a composição das dietas, torna difícil a comparação entre amostras e alguns ensaios estão limitados por amostras reduzidas. Até ao momento, os resultados ainda não apresentam uma perspectiva clara acerca do potencial terapêutico dos mesmos, e não nos permitem chegar a conclusões (Patisaul & Jefferson, 2010).

A semente de soja é utilizada como alternativa à terapia hormonal de substituição (THS), sendo frequentemente recomendada na menopausa. A incidência dos sintomas agudos da menopausa, mais concretamente os vasomotores, varia entre 70-80% nas mulheres ocidentais, contudo só atingem 14-15% das mulheres asiáticas (Cederroth & Nef, 2009). Apesar das diferenças culturais e raciais poderem contribuir para estas variações, foi postulado que uma das possíveis explicações para as mesmas poderá ser derivada da dieta, e, particularmente, dos conteúdos em compostos estrogénios que esta contém, nomeadamente os fitoestrogénios da soja. Nahas e colaboradores estudaram o efeito da soja nos efeitos vasomotores da menopausa, através de um estudo duplamente cego controlado por placebo; concluíram que a soja diminuiu estes sintomas em 44% no grupo controlo e em 10% grupo placebo (Petri Nahas et al., 2004). A adição de soja na dieta de mulheres na pós-menopausa alivia estes sintomas, incluindo os afrontamentos e os suores nocturnos, podendo ser uma alternativa à THS (Baber, 2010).

A investigação acerca dos efeitos da soja na densidade óssea e no risco de osteoporose revelou que a população asiática, apesar de consumir uma dieta pobre em proteínas animais e com baixo consumo de cálcio, apresenta uma menor taxa de fracturas ósseas, quando comparada com as mulheres ocidentais. A associação da dieta rica em soja pela população asiática apresenta efeitos benéficos na osteoporose. As isoflavonas da soja possuem efeitos estrogénicos fracos inibindo directamente a reabsorção óssea e aumentando a massa óssea em mulheres na pós-menopausa. Por outro lado, também influenciam a síntese de vitamina D, estimulando a recaptação do cálcio no osso e aumentando a proliferação das células ósseas. No entanto, os resultados de alguns ensaios clínicos apresentaram efeitos contraditórios (Baber, 2010; Fitzpatrick, 2003; Mateos-Aparicio et al., 2008; Yamori et al., 2002).

A dislipidémia, a pressão arterial e a obesidade, foram associadas a um elevado risco de doenças cardiovasculares. Goodman-Gruen e colaboradores estudaram o efeito da ingestão dos fitoestrogénios da semente de soja na obesidade. O estudo decorreu em 208 mulheres com idades compreendidas entre 45 e 74 anos. Concluíram que a ingestão diária de fitoestrogénios da soja previne as doenças crónicas relacionadas com a obesidade, tais como

---

as doenças cardiovasculares (Goodman-Gruen & Kritz-Silverstein, 2003). Zhan e colaboradores estudaram o efeito da semente de soja no perfil lipídico. Concluíram que o consumo de isoflavonas da soja estava associado a uma redução significativa do colesterol total (3,77%), das lipoproteínas de baixa densidade- LDL (5,25%), dos triglicéridos (7,27%) e a um aumento dos níveis das lipoproteínas de alta densidade- HDL (3,03%)(Zhan & Ho, 2005). As isoflavonas também conferem um efeito vasoprotector, protegendo os vasos sanguíneos da disfunção vascular, através da melhoria das funções oxidativas e do aumento das vias de sinalização antioxidantes. A estimulação da actividade da óxido-nítrico (NO) sintetase e de espécies reactivas de oxigénio (ROS) nas paredes dos vasos sanguíneos em resposta às isoflavonas dietéticas, leva a um aumento da actividade das enzimas antioxidantes nas células endoteliais do músculo liso (Siow & Mann, 2010).

Estudos animais e estudos *in vitro* sugeriram que a soja apresenta efeitos favoráveis sobre os glucose e na regulação da insulina. Liu e colaboradores estudaram o efeito da semente de soja em mulheres na pós-menopausa com hiperglicemia inicial, durante 6 meses. Concluíram que apesar de não existirem alterações significativas nas concentrações de insulina, houve mudanças favoráveis na glucose em jejum (Liu et al., 2011). Uma das complicações associadas à diabetes é o desenvolvimento de retinopatia diabética. Os efeitos anti-angiogénicos das isoflavonas da soja demonstraram vantagens consideráveis no controlo desta doença (Usui, 2006).

O cancro é uma das principais causas de morte, e continua a aumentar. Uma dieta rica em produtos derivados da soja foi associada a uma diminuição da prevalência de alguns carcinomas (Nobert et al., 2006; Virk-Baker et al., 2010). Está bem estabelecido que os estrogénios promovem o cancro da mama e que todos os parâmetros que aumentam o tempo de exposição aos estrogénios durante a vida (menarca precoce, amamentação de curta duração e ausência de filhos) estão associados a um aumento do risco de cancro da mama (Patisaul & Jefferson, 2010). Um dos interesses dos fitoestrogénios da soja está relacionado com a sua actividade estrogénica e com a possibilidade de controlar carcinomas hormono-dependentes. A hipótese prevalente é que estes podem actuar como antiestrogénios quando se encontram na presença de altas concentrações de estrogénios, e como estrogénios quando estão presentes em ambientes com baixas concentrações dos mesmos (Mateos-Aparicio et al., 2008). Dong e colaboradores realizaram uma meta-análise de estudos prospectivos acerca do consumo de isoflavonas da soja e este tipo de cancro. Concluíram que o consumo de soja estava associado a uma diminuição do mesmo na população asiática, mas não na população ocidental (Dong & Qin, 2011). Virk-Baker e colaboradores demonstraram que a terapia com fitoestrogénios da soja pode inibir os processos inflamatórios, a angiogénese e a formação de metástases em vários modelos tumorais *in vivo*, demonstrando benefícios pronunciados quando combinados com radioterapia, em que apresentam uma acção antioxidante (Hillman & Singh-Gupta, 2011; Virk-Baker et al., 2010).

---

---

### 3. Fitoestrogénios

#### 3.1. Os fitoestrogénios como constituintes da semente de soja

Os fitoestrogénios são compostos químicos sintetizados nas plantas, estruturalmente e/ou funcionalmente semelhantes aos estrogénios humanos, e aos seus metabolitos activos. Estão presentes numa grande variedade de vegetais, nomeadamente os cereais, os legumes e os frutos, mas apenas nas leguminosas, que é o caso da soja, se apresentam em concentrações relativamente altas. Uma planta poderá conter mais do que uma classe de fitoestrogénios (Baber, 2010; Usui, 2006).

São polifenóis, classificados de acordo com a sua estrutura química. Incluem os flavonóides (canferol e quercetina), as isoflavonas (genisteína, daidzeína formonectina e equol), os linhanos (enterolactona, enterodiol) os coumestanos (coumestrol) e os estilbenos (resveratrol) (Figura 2) (Benassayag et al., 2002; Zhao & Mu, 2011).

Acredita-se que os fitoestrogénios da soja têm acção sobre alguns mecanismos biológicos tais como proliferação, diferenciação e síntese proteica em diferentes células alvo. Estes efeitos são dependentes da dose, do receptor sob o qual actuam, e do alvo celular. Podem exercer efeitos benéficos sobre o organismo humano, tais como as acções terapêuticas e preventivas da carcinogénese, aterosclerose, osteoporose, e as melhorias na sintomatologia da menopausa, tal como foi anteriormente referido. No entanto, muitos dos estudos experimentais e clínicos que analisaram o impacto do consumo destes compostos, presentes nas sementes de soja, produziram resultados contraditórios. Uma das grandes preocupações é a possibilidade de colocarem em risco a saúde de alguns grupos etários, principalmente os recém-nascidos e as crianças (Cederroth & Nef, 2009; Patisaul & Jefferson, 2010).

A acção destes no organismo está relacionada com a possibilidade de se ligarem aos receptores dos estrogénios (ER). O efeito biológico clássico do 17- $\beta$ -estradiol é mediado através dos receptores celulares ER $\alpha$ , ER $\beta$ . Apesar dos fitoestrogénios apresentarem menores afinidades de ligação ao ER quando comparados com os estrogénios humanos, apresentam uma maior afinidade para o ER $\beta$  que para o ER $\alpha$  (Baber, 2010; Hewitt & Singletary, 2003; Zhao & Mu, 2011).

Além de exercerem efeitos sobre os ER, estudos recentes referem que os fitoestrogénios poderão exercer acção através receptor GPR30, que é um receptor membranar acoplado à proteína G. Esta ligação induz uma resposta celular rápida que envolve a activação do PI3K, mobiliza o cálcio e aumenta a produção de cAMP. A ligação competitiva dos fitoestrogénios e

do 17- $\beta$ -estradiol ao GPR30 foi considerada uma nova abordagem para compreender a acção biológica dos fitoestrogénios (Prossnitz et al., 2008; Zhao & Mu, 2011).

As concentrações de fitoestrogénios nos fluidos biológicos, após administração oral, são muito superiores às dos esteróides endógenos em condições fisiológicas. Registaram-se concentrações de fitoestrogénios 1000 vezes mais elevadas que as dos esteróides endógenos, na urina (Benassayag et al., 2002).

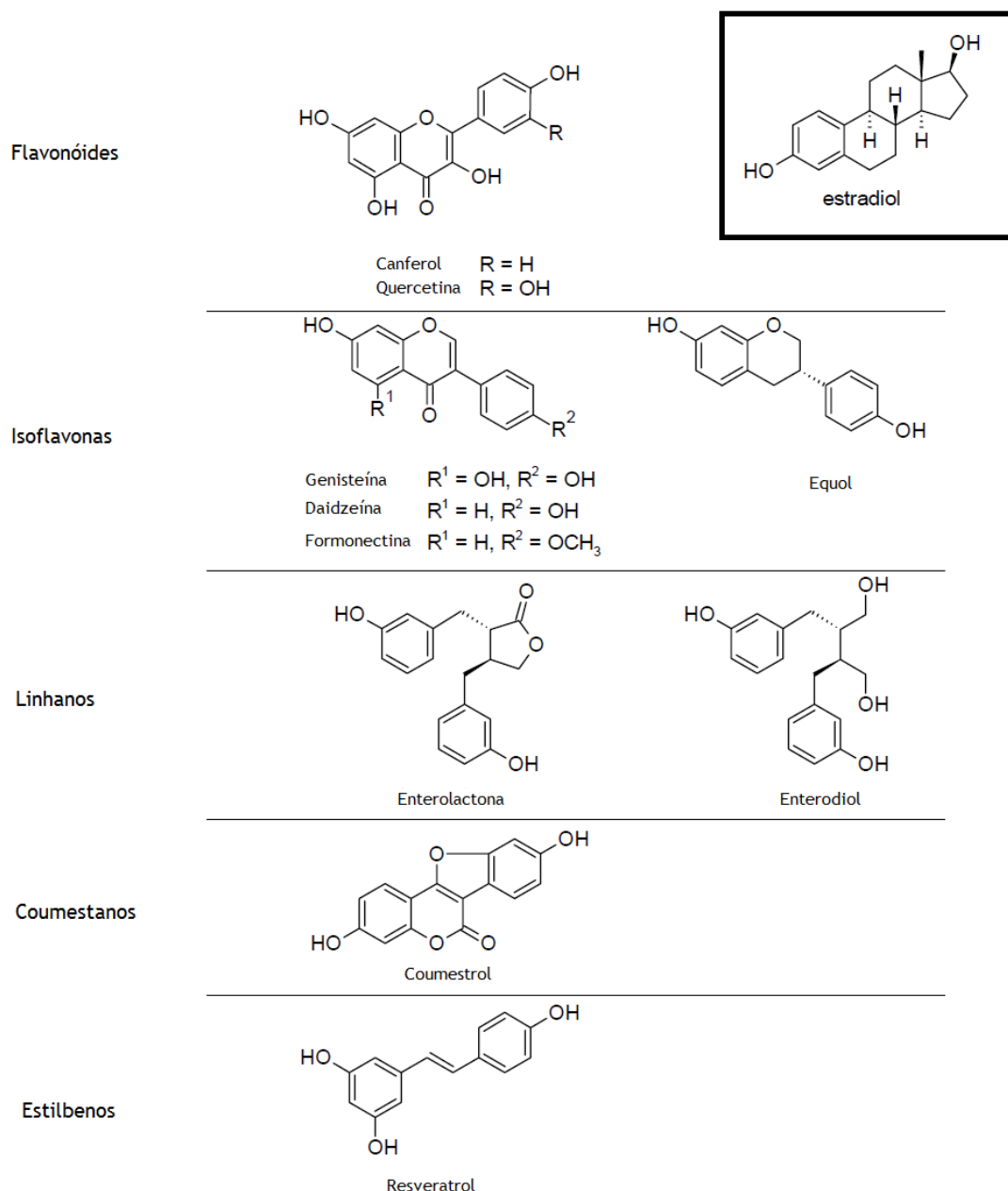


Figura 2- Comparação das estruturas moleculares dos fitoestrogénios e do estradiol. Adaptado de (Zhao & Mu, 2011).

---

As isoflavonas são os fitoestrogénios mais estudados (Baber, 2010). A quantidade de isoflavonas varia de acordo com a variedade de soja, com as condições de cultura e também com o processamento a que são submetidas. Nas sementes de soja, as isoflavonas estão associadas a proteínas. Estas podem ser dissociadas das proteínas usando extracção alcoólica, que diminui significativamente a quantidade de isoflavonas ligadas. Isto explica a variabilidade substancial no conteúdo destas, em produtos contendo soja (0,1 a 5 mg de isoflavonas/g de proteína nas sementes de soja maduras e secas; 0,3 mg de isoflavonas/g de proteína nas sementes de soja pouco maduras e 0,1-2 mg de isoflavonas/g de proteína de semente de soja no tofu e em algumas preparações de leite de soja) (Cederroth & Nef, 2009; Zhao & Mu, 2011).

### 3.2. Isoflavonas da soja

A genisteína (5,7,4'-trihidroxiisoflavona) e a daidzeína (7,4'- dihidroxiisoflavona) são as isoflavonas *major* que ocorrem naturalmente na soja. (Di Virgilio et al., 2004). Estas apresentam uma estrutura não-esteróide, que contém um anel fenólico. Este anel possibilita a ligação destas isoflavonas ao receptor de estrogénio (Cederroth & Nef, 2009). Os 2 anéis benzeno ligados por um anel pirano heterocíclico caracterizam estruturalmente estes compostos (Pavese et al., 2010).

As isoflavonas estão normalmente na forma de conjugados  $\beta$ -D-glicosídeos inactivos, contendo moléculas glicosídicas. A forma não conjugada (agliconas) é a forma biologicamente bioactiva. A proporção das formas conjugadas e não conjugadas varia substancialmente entre os diferentes alimentos. No entanto, os alimentos fermentados à base de soja apresentam quantidades superiores de agliconas em relação aos produtos não fermentados (Patisaul & Jefferson, 2010).

#### 3.2.1. Genisteína

A genisteína possui uma similaridade estrutural com o 17- $\beta$ -estradiol, apresentando um peso molecular, bem como um padrão de hidroxilação idêntico a este. Pode-se ligar às isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  dos ER, e ao receptor membranar GPR30, regulando a expressão de genes (Jian, 2009). A afinidade de ligação desta isoflavona no ER  $\beta$  é cerca de 30 vezes superior que ao ER $\alpha$ , havendo uma competição entre esta e o 17- $\beta$ -estradiol (Banerjee et al., 2008; Chen et al., 2003; Pavese et al., 2010).

---

### *Efeitos biológicos da genisteína*

A genisteína inibe a proliferação das células cancerígenas através de um bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G2/M (Hewitt & Singletary, 2003). Esta isoflavona também demonstrou também inibir o factor nuclear kB (NFkB), um factor transcripcional que regula vias da resposta inflamatória e de proliferação celular, induzindo a apoptose em células de cancro da mama e da próstata (Hsu et al., 2010; Jian, 2009).

É também reconhecida como um potente inibidor da proteína tirosina cinase (PTK) e da topoisomerase II em várias células cancerígenas; diminui os danos oxidativos do ADN e a tumorigénese. A PTK cataliza a fosforilação dos resíduos de tirosina das células tumorais e de outras proteínas, incluindo os factores de crescimento envolvidos na proliferação celular do tumor (Fitzpatrick, 2003; Hewitt & Singletary, 2003). A genisteína também regula a PTK no cérebro, apresentando um efeito neuroprotector (Patisaul & Jefferson, 2010).

Estudos pré-clínicos demonstraram que a genisteína pode ainda inibir a angiogénese e as metástases tumorais, exercendo efeitos na fase inicial do crescimento tumoral primário, bem como nos passos finais da cascata metastática. Estes efeitos foram registados em vários alvos da cascata metastática, essenciais para o processo de adesão celular e de invasão. Ensaio clínicos corroboram os resultados obtidos nestes ensaios pré-clínicos, pois foi demonstrada uma diminuição dos marcadores da doença metastática avançada, tais como o MMP-2 (*Matrix metalloproteinase-2*) e o PSA (antigénio específico da próstata). Estes efeitos foram observados, após serem utilizadas concentrações reduzidas de genisteína, que podem ser alcançadas através do consumo diário de sementes de soja (Pavese et al., 2010).

Mai e colaboradores estudaram o efeito da combinação da genisteína com o tamoxifeno em tumores induzidos por MCF7 em ratos. Concluíram que os 2 componentes actuam sinergicamente, inibindo a proliferação tumoral de cancro da mama hormono-dependente e induzindo a apoptose das células cancerígenas. A modulação dos níveis de estrogénios e da sua actividade biológica é um dos mecanismos no qual a combinação genisteína/tamoxifeno actua exercendo efeitos no crescimento tumoral (Mai et al., 2007).

---

### 3.2.2. Daidzeína

A daidzeína é considerada um composto não tóxico, capaz de induzir a morte celular em vários tipos de células cancerígenas (Jin et al., 2010).

#### *Efeitos biológicos da daidzeína*

Choi e colaboradores demonstraram que a daidzeína interrompe o ciclo celular das células humanas de cancro da mama nas fases G1 e G2/M e concluíram que a actividade da caspase-9 (biomarcador da apoptose) aumentava significativamente. Como a actividade da caspase-9 aumentava, a daidzeína induzia a apoptose através da via intrínseca, regulada através da sinalização celular na mitocôndria (Choi & Kim, 2008). No entanto, apesar de se afirmar que a actividade anti-cancerígena da daidzeína é mediada através da paragem do ciclo celular e da apoptose, os mecanismos específicos ainda não estão bem compreendidos (Jin et al., 2010).

Ju e colaboradores afirmaram que a proliferação celular nas MCF7 induzida pela daidzeína era bloqueada por anticorpos anti-estrogénio, demonstrando que os ER estão envolvidos no seu efeito proliferativo (Ju et al., 2006). A daidzeína parece inibir a viabilidade celular de uma forma dependente da dose e do tempo (Choi & Kim, 2008). Esta isoflavona inibe o crescimento de células cancerígenas ER+ e ER-, de forma diferenciada. Estudos indicam que o efeito antiproliferativo nas células ER+ está sujeito a um fenómeno de saturação dos receptores ER, facto que não ocorre nas células ER-. Concentrações elevadas de daidzeína poderão ser benéficas na quimioprevenção do cancro ER- (Guo et al., 2004).

Bao e colaboradores estudaram o efeito de diferentes doses de daidzeína na formação óssea de osteoblastos. Concluíram que a daidzeína apresentava efeitos bifásicos na osteoporose, dependentes da dose administrada. Enquanto doses elevadas desta isoflavona inibiam a proliferação dos osteoblastos, por actuarem principalmente no PPAR $\gamma$ , doses menores actuavam principalmente nos ER e estimulavam a proliferação dos osteoblastos (Bao et al., 2011).

### 3.3. Metabolismo das Isoflavonas

Após serem consumidos, os glicosídeos das isoflavonas (genistina e daidzina) são rapidamente hidrolizados pelas  $\beta$ -glucosidases bacterianas presentes na parede intestinal, formando as agliconas bioactivas correspondentes (genisteína e daidzeína). Estas podem ser absorvidas pela barreira epitelial intestinal, penetrando na circulação sistémica predominantemente como conjugados de biodisponibilidade limitada (a conjugação ocorre no fígado; a maior

parte é conjugada com ácido glucorónico (95%) e em menor quantidade com o sulfato (5%)(Allred et al., 2004; Usui, 2006).

As isoflavonas conjugadas são submetidas a circulação enterohepática, e sujeitas a biotransformação pela microflora intestinal, originando os seguintes metabolitos:

- A daidzeína é reduzida a di-hidrodaidzeína, que pode ser posteriormente metabolizada a O-DMA (O-desmetilangolensina) ou a equol.
- A genisteína é transformada em dihidrogenisteína e 6'-hidroxi-O-DMA. Finalmente é degradada a ácido 4-hidroxifenil-2 propiónico (Allred et al., 2001; Di Virgilio et al., 2004; Patisaul & Jefferson, 2010; Usui, 2006).

A excreção dos metabolitos conjugados ocorre principalmente na urina, enquanto as formas não conjugadas são excretadas pelas fezes (Klein & King, 2007).

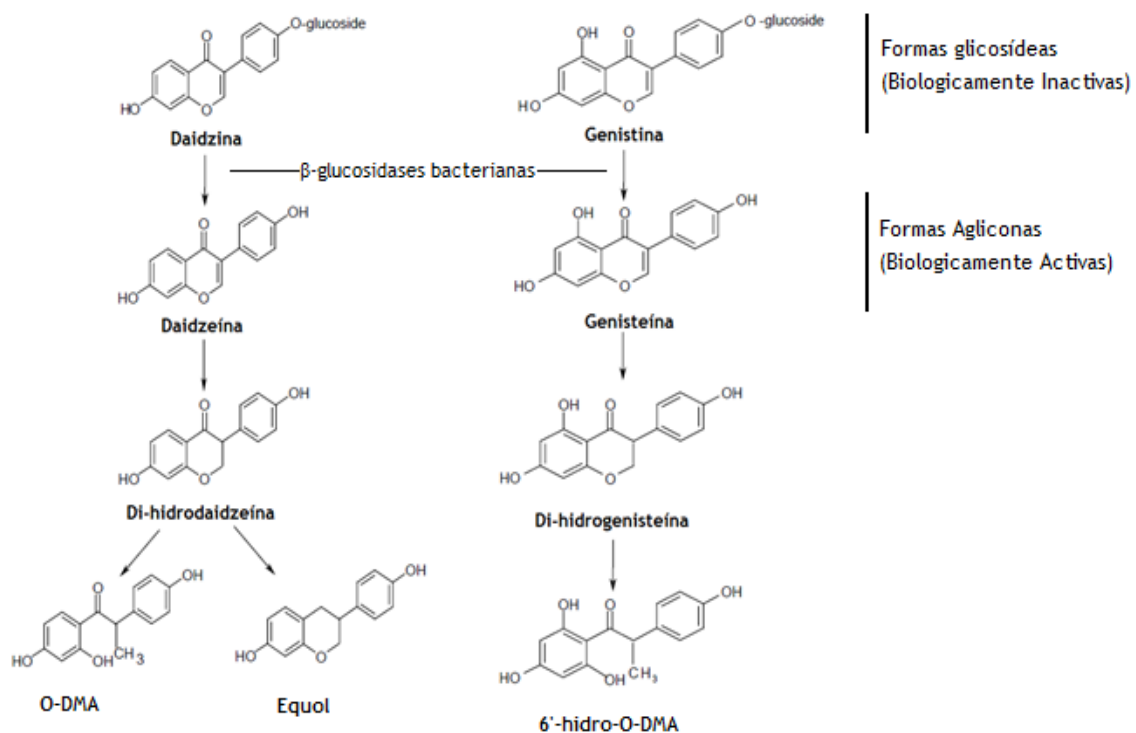


Figura 3- Metabolismo das isoflavonas. Adaptado de (Di Virgilio et al., 2004).

A genisteína e a daidzeína poderão ser obtidas a partir dos seus glucosídeos, ou dos precursores biochanina A e formonectina, respectivamente, pela acção das glucosidases intestinais (Di Virgilio et al., 2004).

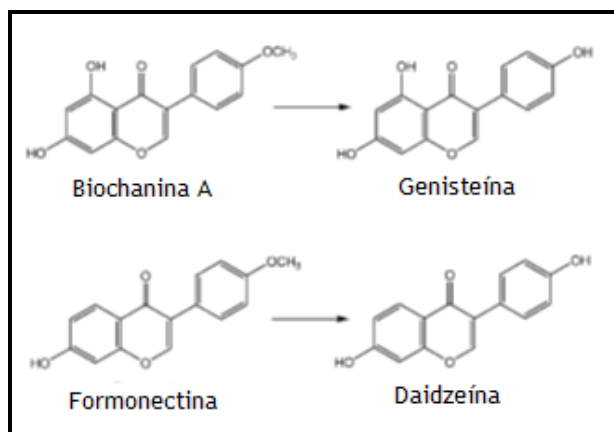


Figura 4- Conversão da biochanina A em genisteína e da formonectina em daidzeína.

Os metabolitos da di-hidrodaidzeína pode ser equol ou a O-DMA (O-desmetilangiolsina). O equol não é encontrado em alimentos de origem vegetal, sendo obtido exclusivamente pela acção de bactérias intestinais sobre a daidzeína. Animais como cavalos, vacas, ovelhas, aves domésticas e ratos são produtores naturais de equol. Para que ocorra a bioconversão da daidzeína no seu metabolito equol, é necessário um microrganismo intestinal muito específico, ainda desconhecido, e esta bioconversão só ocorre em 30 a 50% dos indivíduos. Sabe-se, no entanto, que o equol é produzido em condições de anaerobiose, e que os vegetarianos e os indivíduos de origem asiática são os que apresentam uma maior capacidade para a produção do mesmo. Alguns autores referem que a génese de equol poderá ser crítica para obter os benefícios associados a uma dieta rica em soja, porque esta molécula apresenta uma maior potência estrogénica do que a daidzeína (Patisaul & Jefferson, 2010; Setchell et al., 2005). Não está claramente elucidado quais são factores que influenciam a capacidade da daidzeína se biotransformar em equol e O-DMA, mas os factores genéticos, a fisiologia intestinal e a dieta poderão contribuir para as diferenças interindividuais (Patisaul & Jefferson, 2010).

Estudos farmacocinéticos revelam que os adultos saudáveis absorvem as isoflavonas de uma forma mais rápida e eficiente. Em geral, as concentrações séricas máximas de isoflavonas são atingidas entre as 2 e 8 horas, após a ingestão. Setchell e colaboradores, verificaram que o tempo médio para que a genisteína e daidzeína (formas agliconas) atingissem as concentrações plasmáticas máximas foi de 5,2 e 6,6 horas, respectivamente. Por outro lado, após a ingestão de genistina e daidzina (formas glicosiladas), a concentração plasmática máxima foi atingida após 9,3 e 9,0 horas, respectivamente, indicando que a hidrólise inicial da molécula é uma etapa importante para a absorção das isoflavonas (Cederroth & Nef, 2009; Setchell et al., 2003). Factores que podem influenciar a biodisponibilidade das isoflavonas incluem a microflora intestinal, a dose administrada, o tempo do trânsito intestinal e a composição química das isoflavonas da dieta (Cederroth & Nef, 2009).

---

### 3.4. Outros mecanismos de acção dos fitoestrogénios

Como já foi referido anteriormente, os fitoestrogénios podem interagir com os dois tipos de receptores ER $\alpha$  e ao ER $\beta$ , apresentando uma afinidade relativa cerca de trinta vezes superior para o ER $\beta$  que para o ER $\alpha$ . Enquanto em concentrações baixas, *in vitro*, apresentam características agonistas, estimulando a proliferação celular, em concentrações mais elevadas é a actividade antagonista que prevalece, podendo actuar como activadores ou inibidores da MAPK, respectivamente (Leclercq et al., 2011; Zhao & Mu, 2011).

Os fitoestrogénios actuam também como inibidores enzimáticos, afectando a esteroidogénese na cascata bioquímica. Provocam alterações na produção de progesterona, aldosterona, hidrocortisona, testosterona e estradiol. As isoflavonas, através de mecanismos competitivos, demonstraram inibir enzimas chave nesta cascata bioquímica. Entre estas encontram-se as enzimas 11- $\beta$ -hidroxilase (CYP11B1), 17- $\alpha$ -hidrolase (CYP17A1) ou 21-hidrolase (CYP21A1). As isoflavonas também podem inibir a aromatase (CYP19) (IC<sub>50</sub> entre 0,3 e 85  $\mu$ M). Estes efeitos, em oposição aos esperados nos tratamentos na pós-menopausa (deplecção dos níveis de estradiol), podem ajudar a explicar as acções protectoras destas em cancros da mama hormonodependentes (Leclercq et al., 2011).

Os fitoestrogénios podem modular a actividade das proteínas de ligação ao cálcio. Por exemplo, sub-regulam a calbindina, que apresenta um papel importante no desenvolvimento e função do SNS (Leclercq et al., 2011).

Os mecanismos intracelulares dos fitoestrogénios, para protecção da proliferação celular no cancro da mama, poderão ser:

- 1- Ligação ao ER nuclear e inibição da expressão de genes, mediada por ER-genómicos;
- 2- Interação com o ER membranar, com bloqueio subsequente das proteínas cinases e supressão dos factores de transcrição;
- 3- Inibição da activação do GFR (Growth factor receptor) e das suas vias de sinalização;
- 4- Activação das caspases para iniciar a apoptose celular;
- 5- Redução das vias de sinalização celular mediadas pela proteína G, em cancros da mama ER- (Zhao & Mu, 2011).

---

## 4. Estrogénios

Os estrogénios referem-se a um grupo de hormonas dotadas de inúmeras acções fisiológicas, estando directamente relacionados com o crescimento e homeostase, diferenciação, processo inflamatório, metabolismo e função de diversos tecidos reprodutivos bem como tecidos não reprodutivos (por exemplo sistema cardiovascular, músculo esquelético ou SNC) (Bjornstrom & Sjoberg, 2005; Kumar et al., 2010).

Muitas mulheres usam estrogénios, como constituinte primário da medicação contraceptiva, na idade fértil. Na menopausa, os estrogénios também são usados sob a forma de terapia hormonal de substituição (THS). Os benefícios da THS incluem o alívio instantâneo dos sintomas vasomotores característicos desta fase, dos problemas cardiovasculares e atrasam o início possível da osteoporose e doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer (Nilsen, 2008; Prossnitz et al., 2008). No entanto, a THS pode apresentar efeitos deletérios na saúde das mulheres na pós-menopausa. Foi observado um aumento da doença das artérias coronárias, AVC, embolismo pulmonar e demência vascular nas mulheres que recebiam a THS. Outros estudos referiram ainda, que a THS estava relacionada com o aumento do risco de desenvolver cancro da mama, do endométrio e do ovário (Kumar et al., 2010).

O organismo produz naturalmente 3 formas principais de estrogénio: estrona (E1), 17- $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3). De todas as hormonas estrogénicas, o 17- $\beta$ -estradiol (E2) é a forma fisiologicamente activa do estrogénio. A estrona aumenta após a menopausa, quando as glândulas adrenais apresentam um papel mais importante na síntese hormonal que os ovários. O estriol é considerado o estrogénio mais fraco, e apresenta um efeito mais curto que o 17- $\beta$ -estradiol e a estrona, no entanto dependendo da dosagem e da via de administração, pode apresentar um efeito estrogénico no tecido alvo (Gruber et al., 2002; Kumar et al., 2010).

### 4.1. Recursos endógenos de estrogénios

Os recursos primários de estrogénios na mulher são a teca, as células granulosas e os derivados luteinizados destas células, presentes nos ovários. Na puberdade, as raparigas iniciam pulsos nocturnos de baixa amplitude de gonadotropinas, que vão aumentando gradualmente as concentrações serológicas de estrogénios. Durante o ciclo menstrual a sua produção varia de forma cíclica. Os maiores valores serológicos de estrogénios ocorrem na fase pré-ovulatória e os menores valores na fase pré-menstrual. Na perimenopausa, a deplecção dos folículos ovarianos leva a uma diminuição da produção do estrogénios nos

---

ovários, apesar das suas concentrações serológicas poderem variar consideravelmente. Em mulheres na menopausa as concentrações serológicas de estrogénios são mais reduzidas e a maioria destes são formados através da conversão da testosterona em tecidos extra-gónadas, que aumenta em função da idade e do peso (Bjornstrom & Sjoberg, 2005; Gruber et al., 2002).

## 4.2. Síntese dos estrogénios

Os estrogénios são esteróides C-18 derivados do colesterol, caracterizados pela presença de um anel aromático (A) e um grupo hidroxifenólico em C3. Apresentam também um grupo hidroxilo em C17 no caso do E2 ou um grupo cetona na mesma posição no caso da E1 (Hall & Phillips, 2005; Mitrunen & Hirvonen, 2003).

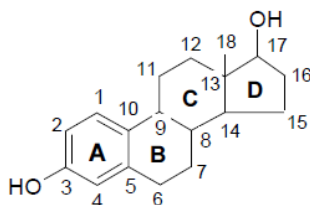


Figura 5- Estrutura química do 17-β-estradiol.

A biossíntese dos estrogénios envolve uma série de passos enzimáticos, sendo iniciada com o colesterol. Após ligação aos receptores lipoproteicos, o colesterol é captado pelas células esteroidogénicas, armazenado e movido para os locais de síntese. O passo limitante na produção dos esteróides é a transferência do colesterol do citosol para a membrana interna das mitocôndrias, onde estão localizadas as enzimas do CYP450 que catalizam a clivagem da cadeia lateral do colesterol formando a pregnolona (CYP11A). A partir da pregnolona ocorre a síntese da androstenediona, por 2 vias distintas, (Figura 6). A aromatização, último passo da síntese, é catalizada pelo CYP19, que está presente no retículo endoplasmático liso e que converte os androgénios a estrogénios. A estrona e o estradiol são formados a partir dos seus precursores androstenediona e testosterona, respectivamente (Gruber et al., 2002; Hall & Phillips, 2005; Mitrunen & Hirvonen, 2003).

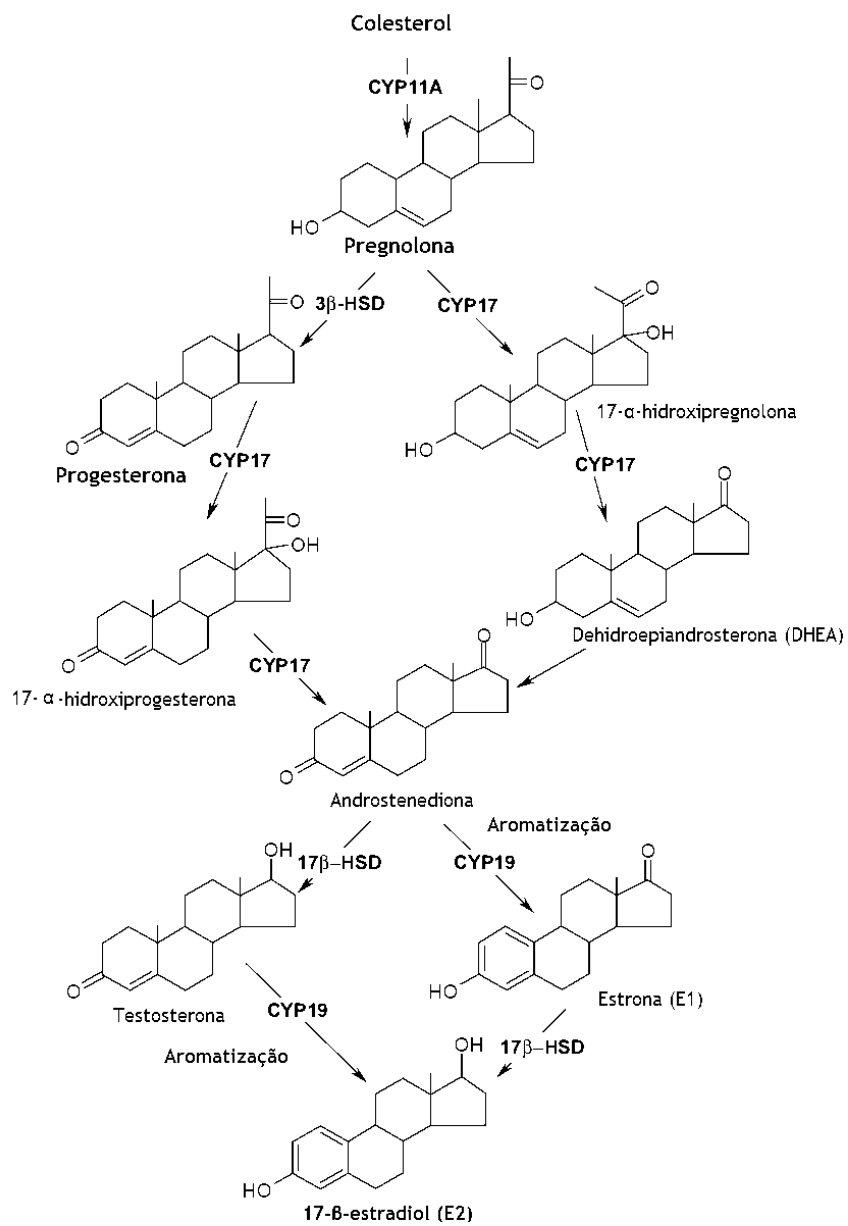


Figura 6- Síntese dos estrogénios. Adaptado de (Mitrunen & Hirvonen, 2003).

### 4.3. Transporte e Metabolismo dos estrogénios

No soro, o estradiol liga-se reversivelmente a uma  $\beta$ -globulina (globulina de ligação a hormonas sexuais), e com uma menor afinidade à albumina, de uma forma não saturável e não estequiométrica (Gruber et al., 2002).

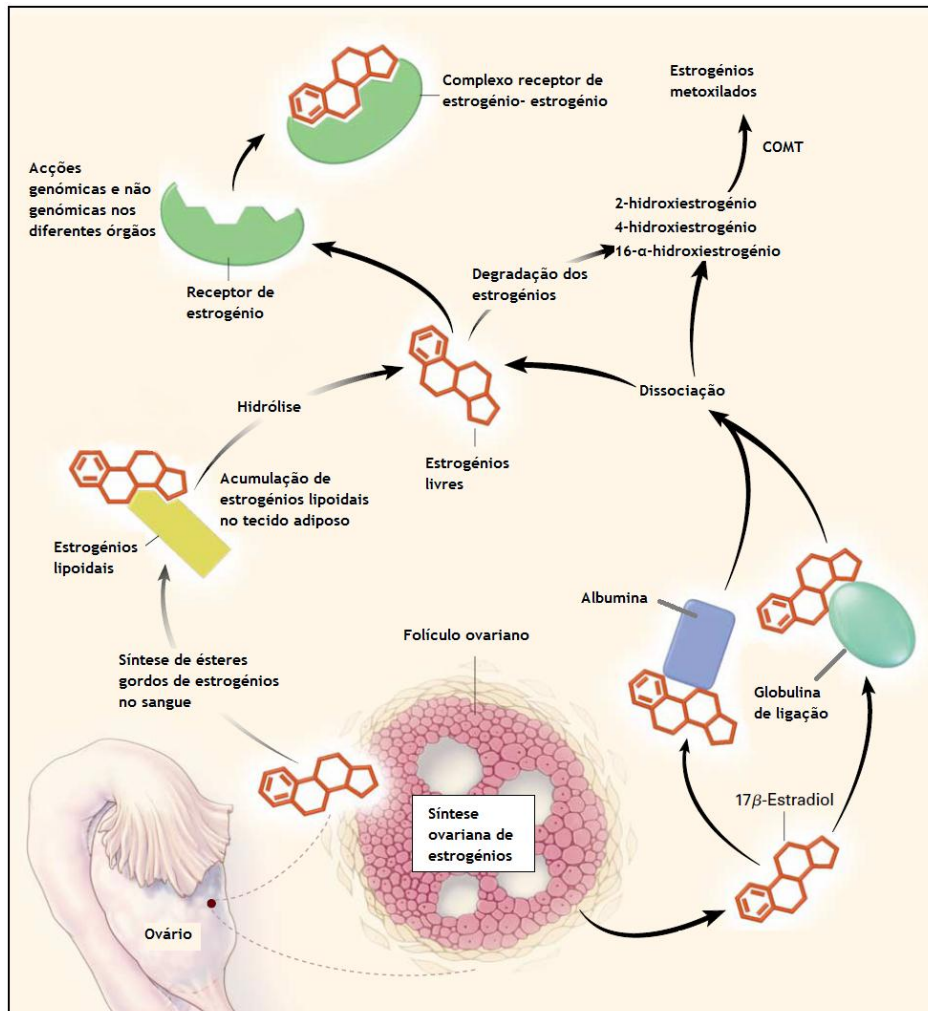


Figura 7- Síntese ovariana, transporte e metabolismo dos estrogénios. Adaptado de (Gruber et al., 2002).

Os estrogénios são eliminados através da conversão metabólica para metabolitos estrogénicos inativos que podem ser excretados na bÍlis, urina e fezes. O primeiro passo do metabolismo consiste numa hidroxilação do anel A ou do anel D. Da hidroxilação do anel A resulta o metabolito major de estradiol, 2-hidroxiestrogénio e o metabolito 4-hidroxiestrogénio, catalizados pelas isoformas CYP1A2, 3A4 e 1A1 no caso do primeiro e pela CYP1B1 no caso do segundo. No caso da hidroxilação do anel D resulta o 16- $\alpha$ -hidroxiestrogénio (Mitrunen & Hirvonen, 2003; Tsuchiya et al., 2005).

---

A via pela qual o 2-hidroxiestrogénio é produzido é considerada anticarcinogénica, no entanto o 4-hidroxiestrogénio gera radicais livres, que correspondem às formas semi-quinona e quinona, formadoras de aductos com o ADN e que causam dano celular, sendo um mecanismo considerado carcinogénico. O 2-hidroxiestrogénio e o 4-hidroxiestrogénio vão ser inactivados através da metilação pela COMT (catecol O-metiltransferase) sendo considerada como uma das principais vias de destoxificação. No entanto também podem ser conjugados por glucoronidação e sulfatação (Chandrasena et al., 2008; Tsuchiya et al., 2005). As quinonas podem ser conjugadas com glutathione (GSH), catalizadas pelas GST ou reduzidas pela quinona redutase. As semiquinonas podem reagir com o oxigénio molecular para formar radicais superóxidos, que são reduzidos a peróxido de hidrogénio, quer espontaneamente, quer catalizados por superóxido dismutases (Mitrunen & Hirvonen, 2003).

Os estrogénios lipoidais são ésteres de ácidos gordos de estrogénios, que compõem uma classe separada de hormonas esteróides. Embora sejam produzidos em vários tecidos *in vitro*, são encontrados predominantemente no tecido adiposo. São sintetizados no sangue onde circulam e se ligam às lipoproteínas, sendo mais resistentes ao catabolismo que os estrogénios (Gruber et al., 2002).

#### 4.4. Receptores de estrogénios

À semelhança dos fitoestrogénios, os efeitos biológicos do 17- $\beta$ -estradiol são mediados por 2 isoformas conhecidas de receptores de estrogénios, referidas como ER $\alpha$  e ER $\beta$  e por um receptor de membrana acoplado à proteína G, GPR30 (Bai & Gust, 2009; Nilsson et al., 2001).

Os ER pertencem a uma superfamília de receptores nucleares e actuam como factores de transcrição regulados pela ligação à hormona e encontram-se diferencialmente distribuídos pelo organismo. Estes são geralmente encontrados na membrana celular, citosol, bem como no núcleo e nas mitocôndrias das células neuronais e não neuronais (Kumar et al., 2010). São expressos em diferentes tipos de tecidos, no entanto ocorrem algumas diferenças nos seus padrões de expressão. ER $\alpha$  encontra-se no endométrio, mama, estroma ovariano e tecido hipotalâmico, enquanto o ER $\beta$  se localiza no rim, cérebro, osso, coração, pulmões, mucosa intestinal, próstata e células endoteliais. A distribuição espacial dos receptores pode ser alterada ao longo da vida (Bai & Gust, 2009; Taylor et al., 2009).

Os ER têm como principal função a ligação de factores de transcrição do ADN, que regulam a expressão de genes. A estimulação dos ER pode ser quer benéfica através do controlo hormonal durante o período fértil, controlo da produção de colesterol, equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, ou prejudicial devido à proliferação do tecido mamário e

---

uterino em casos de cancro. Na ausência da hormona, os ER estão localizados no citosol (Bai & Gust, 2009; Taylor et al., 2009).

#### 4.5. Mecanismo de acção dos estrogénios

As acções nucleares específicas dos estrogénios são determinadas pelos seus efeitos sobre os tecidos-alvo. Estes efeitos são dependentes da estrutura da hormona, do subtipo ou isoforma do ER envolvido, pelas características do gene promotor alvo e pelo balanço dos co-activadores e dos co-repressores que modulam a resposta transcripcional final dos complexos de estrogénios e dos ER (Kumar et al., 2010; Millas I., 2009).

Durante muitos anos, pensou-se que as hormonas esteróides actuavam exclusivamente a nível genómico, mas está demonstrado que os mecanismos de acção do E2 sobre as células alvo podem ser genómicos e não genómicos (Silva et al., 2010).

##### 4.5.1. Mecanismos de acção genómica

Os mecanismos de acção genómica ou genotrópica são normalmente lentos, e podem exercer acção biológica após algumas horas (Silva et al., 2010).

No estado inactivo, o ER existe como um heterocomplexo, ligado a chaperones tais como a HSP90 (heat-shock protein 90). O papel da HSP 90 e das outras chaperones é estabilizar os receptores num estado inactivo, numa conformação apropriada para responder rapidamente à sinalização hormonal (Bai & Gust, 2009). Após ligação do E2, o ER torna-se activo através de um processo que envolve mudanças conformacionais no receptor, permitindo a dissociação do ER a partir das chaperones proteicas. Segue-se a dimerização do receptor e subsequente ligação do dímero aos ERE (elementos de resposta ao estrogénio). Após ligação aos ERE é iniciada a transcrição genética, que é regulada por co-factores proteicos. Os co-activadores possuem a capacidade de aumentar a actividade transcripcional do receptor, enquanto os co-repressores interagem com os receptores e competem com as proteínas co-activadoras (Bai & Gust, 2009).

Os ERs também regulam a transcrição sem se ligarem directamente ao ADN. Por este mecanismo de acção genómica, os ERs medeiam a transcrição de genes alvo, que não possuem o ERE, através de interacções proteína-proteína com outros factores transcripcionais, tais como a proteína activadora-1 (AP-1) e a proteína estimuladora-1 (SP-1), que activam a expressão genética (Bai & Gust, 2009; Silva et al., 2010).

#### 4.5.2. Mecanismos de acção não genómica ou extranuclear

Os mecanismos de acção não genómica envolvem a activação de vias de transdução de sinal, que promovem respostas rápidas (alguns minutos). Resultam de uma acção estrogénica directa nas membranas celulares ou no citosol e podem ser mediadas por receptores de estrogénio, encontrando-se em diversos tipos de células (Shanle & Xu, 2011).

O mecanismo da sinalização não genómica não está bem elucidado e pensa-se que seja mediado por ER de membrana, ou receptores distintos do ER $\alpha$  e do ER $\beta$ , tais como o receptor GPR30. Este receptor encontra-se acoplado à proteína G, medeia uma sinalização estrogénica rápida, independente de ER, que pode levar à mobilização do cálcio intracelular, à activação da cascata de sinalização do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e da proteína cinase activada por mitogénio (MAPK) e à estimulação da produção de AMPc. (Prossnitz et al., 2008; Silva et al., 2010).

As acções não genómicas dos estrogénios aumentaram o grau de complexidade das respostas reguladas por esta hormona, contudo as evidências crescentes das interacções entre os efeitos genómicos e não genómicos do estrogénio podem vir a oferecer novos alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos (Silva et al., 2010).

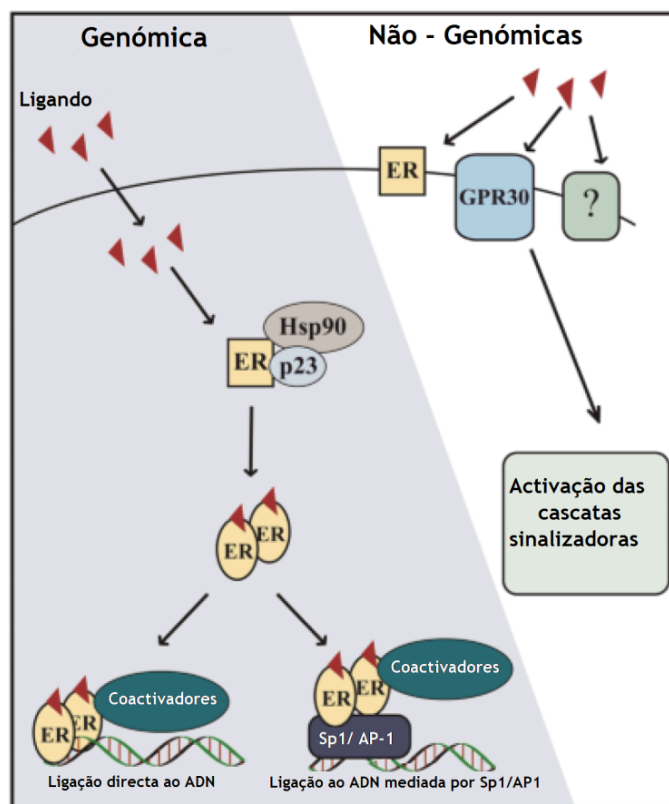


Figura 8- Mecanismos de acção do estrogénio. Adaptado de (Shanle & Xu, 2011).

---

---

## 5. Cultura de células: Modelo experimental para o estudo de compostos estrogénicos

O uso de culturas de linhas celulares tem vindo a aumentar exponencialmente nas áreas de fisiologia, farmacologia e toxicologia. Tornaram-se indispensáveis para a investigação, nomeadamente em biologia molecular e celular, podendo contribuir para uma diminuição do uso de animais em experimentação (Gstraunthaler, 2003).

A cultura de células apresenta algumas vantagens entre as quais se destacam:

- Facilidade de execução na maioria dos laboratórios;
- Possibilidade de estudar fenómenos inacessíveis em tecidos intactos;
- Controlo das condições ambientais (pH, temperatura, concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>);
- Obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas;
- Economia de reagentes e de tempo;
- Menos dispendiosas que um ensaio clínico;
- Podem ser avaliados mecanismos específicos, em condições controladas (Markowitz et al., 2008).

No entanto as culturas de células podem despoletar algumas dificuldades de extrapolação para um organismo vivo.

Uma das limitações para estabelecer correctamente as acções e a aplicação terapêutica de diferentes compostos estrogénicos, é a dificuldade em comparar os trabalhos desenvolvidos pelos diferentes autores, uma vez que os modelos de estudo utilizados variam de trabalho para trabalho. É fundamental validar modelos experimentais que permitam estandardizar este tipo de estudos.

---

---

# Objectivos

Este trabalho tem como objectivo principal estudar o efeito do extracto de soja, dos fitoestrogénios que o integram “*per se*” e do 17- $\beta$ -estradiol em culturas de células humanas.

Para alcançar este objectivo desenvolveram-se os seguintes estudos:

- Optimização dos protocolos experimentais para a determinação da viabilidade celular;
- Acção do 17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja, daidzeína e genisteína na viabilidade celular em fibroblastos saudáveis da derme humana e em células epiteliais MCF7;
- Acção do 17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja, daidzeína e genisteína na capacidade de indução da apoptose em fibroblastos saudáveis da derme humana e em células epiteliais MCF7;
- Estudo preliminar da resposta na viabilidade celular das células NHDF e MCF7 aos compostos comerciais de extracto de soja e 17- $\beta$ -estradiol aconselhados na terapia hormonal de substituição (THS).

---

---

# Material e Metodologia

## 1. Material

### 1.1. Reagentes

- Meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), Sigma Aldrich (Portugal);
- HEPES (10 nM), Sigma Aldrich (Portugal);
- L-Glutamina (2nM), Sigma Aldrich (Portugal);
- Piruvato de sódio (1nM), Sigma Aldrich (Portugal);
- Soro bovino fetal (FBS), Biochrom AG (Portugal);
- Antibiótico AB (Solução de estreptomicina e penicilina);
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Sigma Aldrich (Portugal);
- 0,025 % Tripsina em PBS/EDTA, Sigma Aldrich (Portugal);
- Azul triptano 0,4%, Merk (Alemanha);
- DMSO- Dimetilsulfóxido, Sigma Aldrich (Portugal);
- MTT, Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio; Sigma Aldrich (Portugal);
- Água MilliQ- Millipore;
- Tampão glicina Sorenson (solução de 0,1M glicina, 0,1M NaCl com pH ajustado a 10,5 com 0,1M NaOH);
- Tampão fosfato salino - PBS;
- "Binding Buffer" (0,1M HEPES (pH 7,4), 1,4M de NaCl e 25 mM CaCl<sub>2</sub>);
- Anexina V- FITC, BZ Bioscience;
- Iodeto de Propídeo (50µg/mL), BZ Bioscience.

### 1.2. Compostos testados nas células humanas

- 17-β-estradiol, Sigma Aldrich (Portugal);
- Isoflavona de soja- Daidzeína, Sigma Aldrich (Madrid);
- Isoflavona de soja- Genisteína, Sigma Aldrich (Madrid);
- Preparação comercial de extracto de Soja (180 mg de extracto /cápsula);
- Preparação comercial de 17-β-estradiol (2 mg de 17-β-estradiol /comprimido).

---

### 1.3. Instrumentação

- Incubadora- Bioblock Scientific- Sigma Aldrich;
- Centrifugadora NuAire, DHD Autoflow;
- Câmara de fluxo laminar vertical, NuAire, Classe II;
- Vórtex, VELT Científica;
- Leitor espectrofotométrico de microplacas, Anthos 2020;
- Citómetro de fluxo (Becton Dickinson)- BD FACSCalibur;
- Potenciómetro medidor de pH, Metrohm 620.

## 2. Preparação dos compostos utilizados

### 2.1. Preparação do extracto de soja comercial (180mg/cápsula)

O extracto de soja utilizado foi obtido através de uma preparação comercial, apresentado sob a forma de cápsulas. Cada cápsula continha 180 mg de extracto de soja. A caracterização do extracto está demonstrada na figura 9.

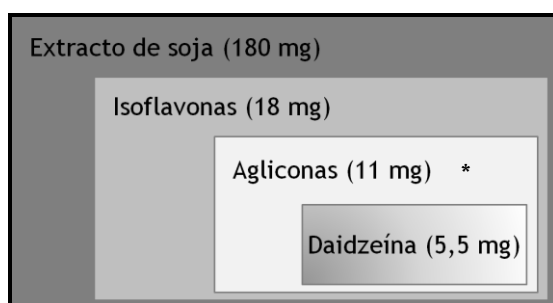
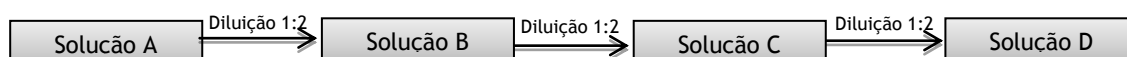


Figura 9- Caracterização do extracto de soja.

(\* no extracto estudado não estava descrito o teor em genisteína)

A quantidade de composto sólido correspondente às 180 mg de extracto de soja foi dissolvida em 1 mL de DMSO. Agitou-se a mistura no vórtex e posteriormente filtrou-se através um filtro de 22 µm. Obteve-se uma solução inicial com uma concentração de 180µg/µL (Solução A).

A partir solução A, foram preparadas as soluções a utilizar nas células, tendo sido estas obtidas através de diluições em DMSO. Foram preparadas 3 diluições diferentes: Solução B, Solução C e Solução D.



---

Em cada poceto foi administrado 1  $\mu\text{L}$  de cada solução preparada, o qual já continha previamente 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. As concentrações finais em contacto com as células foram as representadas na tabela seguidamente referida.

Tabela 1- Concentrações das diluições de extracto de soja preparadas e concentrações aplicadas nas culturas celulares.

Diluições	Concentrações das soluções de extracto de soja preparadas	Concentrações em contacto com as células
Solução A	180 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	360 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solução B	90 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	180 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solução C	45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	90 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solução D	22,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	45 $\mu\text{g}/\text{mL}$

## 2.2. Isoflavonas da soja

As isoflavonas de soja estudadas foram a daidzeína e a genisteína.

Para preparar a solução inicial de genisteína, dissolveram-se 5 mg da formulação comercial em 2 mL de DMSO, obtendo-se uma concentração final de 9,25 mM. A solução obtida foi repartida em alíquotas de 60  $\mu\text{L}$ .

A preparação da solução inicial de daidzeína consistiu na diluição de 5 mg de daidzeína pulverizada em 2 mL de DMSO, obtendo-se a concentração de 9,83 mM. Dividiu-se a solução final por alíquotas de 60  $\mu\text{L}$ .

As alíquotas preparadas foram armazenadas em tubos *ependorf* e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para uso posterior nos ensaios realizados. As concentrações de genisteína e daidzeína testadas nas culturas celulares foram 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , obtidas através da diluição da solução inicial em meio de cultura.

A preparação das soluções de extracto de soja, daidzeína e genisteína, foi realizada com base no procedimento utilizado por Varani e colaboradores (Varani et al., 2004).

---

### 2.3. 17- $\beta$ -Estradiol

A preparação de solução inicial de 17- $\beta$ -estradiol consistiu na dissolução da forma pulverizada do mesmo em DMSO, para obter uma solução inicial com uma concentração de  $10^{-2}$  M.

A partir desta solução inicial foram preparadas 2 soluções intermédias com concentrações de  $10^{-3}$  M e  $10^{-5}$  M diluídas em meio de cultura.

A partir da solução intermédia de  $10^{-5}$  M foram preparadas as concentrações requeridas para o trabalho experimental. As concentrações utilizadas foram 1 nM, 10 nM, 50 nM e 100 nM.

### 2.4. Preparação do 17- $\beta$ -Estradiol comercial (2 mg/comprimido)

Foi dissolvido um comprimido de 2 mg de estradiol, correspondente à dose diária na terapia hormonal de substituição, em 1 mL de DMSO. O conteúdo foi agitado no vórtex e filtrado com um filtro de 22  $\mu$ m, obtendo-se uma solução inicial (Solução A) com uma concentração de 2 mg/ml.

A partir desta solução inicial foram preparadas as diluições em DMSO, semelhantes às preparadas com o extracto de soja. As concentrações finais em contacto com as células estão referidas na tabela seguinte.

Tabela 2- Concentrações das diluições da preparação comercial de 17- $\beta$ -estradiol usada na terapia hormonal de substituição aplicadas nas culturas celulares.

Diluições	Concentrações das soluções de extracto de soja preparadas	Concentrações em contacto com as células
Solução A	2 $\mu$ g/ $\mu$ L	4 $\mu$ g/mL
Solução B	1 $\mu$ g/ $\mu$ L	2 $\mu$ g/mL
Solução C	0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L	1 $\mu$ g/mL
Solução D	0,25 $\mu$ g/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ g/mL

---

### 3. Linhas celulares

Uma linha celular permite definir uma população de células que são mantidas em cultura por um determinado período de tempo (Gstraunthaler, 2003). Para podermos realizar este estudo, foram utilizadas 2 linhas celulares distintas: células epiteliais cancerígenas MCF7 e fibroblastos saudáveis da derme humana NHDF.

#### 3.1. MCF7

As MCF7 (ATCC) são uma linha celular de células epiteliais, isoladas a partir de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos que apresentava cancro da mama metastático. MCF7 é o acrónimo de Michigan Cancer Foundation-7, referindo-se ao instituto onde pela primeira vez estas células foram isoladas. Esta linha celular deriva de um adenocarcinoma mamário. As células possuem características aderentes, crescimento em monocamada e apresentam receptores de estrogénio (ER+) (Levenson & Jordan, 1997). As MCF7 foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e com 1% de antibiótico (AB), numa incubadora a 37°C e numa atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias e as células foram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência de 70-80% era alcançada.

#### 3.2. NHDF

As NHDF (ATCC) são fibroblastos saudáveis derivados da derme humana e possuem receptores de estrogénio (ER). A distribuição do ER $\alpha$  foi detectada nos compartimentos citosólicos e no núcleo dos fibroblastos e o ER $\beta$  também foi detectado (Haczynski et al., 2002). As NHDF foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, 2nM de L-glutamina, 10nM HEPES, 1nM piruvato de sódio e 1% de antibiótico AB, numa incubadora a 37°C e numa atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com todos os aditivos referenciados anteriormente) foi substituído a cada 2 a 3 dias e as células foram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência de 70-80% era alcançada.

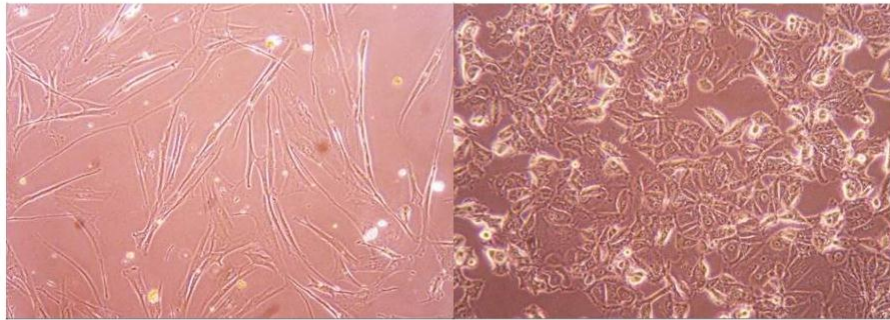


Ilustração 1- Linhas celulares usadas no modelo de estudo. Figura da esquerda- linha celular NHDF. Figura da direita- linha celular MCF7.

## 4. Preparação dos meios de cultura utilizados na cultura de células

### 4.1. RPMI (meio de cultura utilizado na linha celular NHDF)

A preparação do meio de cultura RPMI consistiu na adição de HEPES (10nM), L-glutamina (2nM), piruvato de sódio (1nM) e 1% de antibiótico AB ao RPMI-1640. Poderia ainda ser adicionado o suplemento FBS (*fetal bovine serum*) a 10% (v/v), dependendo das condições requeridas. Considera-se o meio de cultura suplementado com FBS como RPMI completo e o meio de cultura sem a adição de FBS como RPMI incompleto.

### 4.2. DMEM (meio de cultura utilizado nas MCF7)

A preparação de DMEM consistiu na dissolução de 1 frasco de DMEM liofilizado e de  $\text{NaHCO}_3$  (2,5g por litro) em 1 L de água MiliQ. O pH da mistura resultante foi ajustado a 7,4 no potenciômetro e adicionou-se 1% de AB. O suplemento FBS (*fetal bovine serum*) a 10% (v/v) poderia ser adicionado, dependendo das condições requeridas. Considera-se o meio de cultura suplementado com FBS como DMEM completo e o meio de cultura sem a adição de PBS como DMEM incompleto.

Após preparação, cada um dos meios foi filtrado com o sistema de vácuo em câmara de fluxo laminar vertical, e, seguidamente identificado. Para utilização dos meios de cultura nas linhas celulares, foi necessário um aquecimento prévio num banho de água a 37°C. O armazenamento dos mesmos foi a uma temperatura de 4°C.

---

## 5. Técnicas aplicadas

### 5.1. Tripsinização

Após atingirem 70 a 80% de confluência, as células foram divididas por mais frascos de cultura. Para tal foi realizado o procedimento da tripsinização. Este procedimento iniciou-se pela aspiração a vácuo do meio de cultura existente no interior do frasco. De seguida foram colocados cerca de 10mL (no caso de um frasco de 75cm<sup>3</sup>) de tripsina-EDTA (0,025%) em contacto com as células. O frasco de cultura foi colocado numa incubadora, durante 2 a 3 minutos, a 37°C e numa atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub>, para acelerar a reacção enzimática. Este processo foi acompanhado por observação microscópica. Após confirmação microscópica de que as células se encontravam desagregadas do frasco de cultura, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura completo, aquecido a 37°C, e a suspensão celular resultante foi centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado com meio de cultura. A suspensão celular resultante foi dividida por novos frascos de cultura.

### 5.2. Armazenamento das células

As células foram armazenadas na presença de um reagente crioprotector (DMSO) em azoto líquido (-180°C). Este modo de armazenamento permite que as linhas celulares sobrevivam por um período de tempo superior a três anos. As linhas celulares utilizadas no decorrer deste trabalho estavam armazenadas em bancos de células. Para se proceder à sua utilização, descongelou-se a temperatura ambiente, o conteúdo do tubo de crioconservação. Foram aquecidos cerca de 20 mL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS (RPMI caso se tratasse da linha celular NHDF ou DMEM caso se tratasse da linha celular MCF7), onde foi adicionado o conteúdo do tubo de crioconservação. Este foi centrifugado a 1000 rpm durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado no meio de cultura adequado, de forma a remover todo o DMSO. A ressuspensão celular foi colocada num frasco, adicionou-se meio de cultura correspondente ao tipo de linha celular (cerca de 15 mL para um frasco de 75 cm<sup>3</sup>), e o frasco foi incubado a uma temperatura de 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida.

Ao longo deste trabalho laboratorial, células provenientes de culturas confluentes de diferentes passagens foram congeladas e armazenadas. Para tal, aplicou-se o processo de tripsinização nas culturas celulares confluentes. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante ressuscitado em meio de cultura, enriquecido com 10% de FBS e com 5% de DMSO. A suspensão final foi dividida por tubos de crioconservação (1 mL por cada tubo), colocados a -20°C durante 4 horas, mantidos a -80°C por 1 a 3 dias, e finalmente armazenados em azoto líquido a -180°C.

---

### 5.3. Contagem de células

Para a contagem do número de células procedeu-se do seguinte modo: após tripsinização das culturas celulares, o pellet resultante foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura completo. A 10 µL da suspensão celular foram adicionados 10 µL de azul de tripano e o conteúdo resultante foi aplicado numa câmara de *Neubauer*, procedendo-se à sua contabilização.

## 6. Testes realizados para analisar a viabilidade celular e a morte celular em culturas de células *in vitro*

### 6.1. Ensaio MTT

O MTT é um ensaio colorimétrico descrito como um método muito útil para a medição da citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*. É preciso, sensível, rápido e conveniente. A quantidade de células viáveis pode ser estimada através da leitura espectrofotométrica, cujas características são a simplicidade, e a segurança nos resultados obtidos (van Meerloo et al., 2011).

Este ensaio depende do número de células presentes, bem como da actividade mitocondrial celular e baseia-se na redução do sal MTT a cristais de formazano (produto corado de azul), pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, existente no interior das células viáveis. A quantidade de formazano produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes e que apresentam uma respiração celular activa, ou seja, quando maior for a absorvência detectada no espectrofotómetro, maior a quantidade de células vivas. Este ensaio permite ainda quantificar os efeitos citotóxicos e a sensibilidade das células a determinados fármacos. O MTT requer algumas precauções no seu manuseio por ser tóxico, perigoso e sensível à luz. (van Meerloo et al., 2011; Wan et al., 1997).

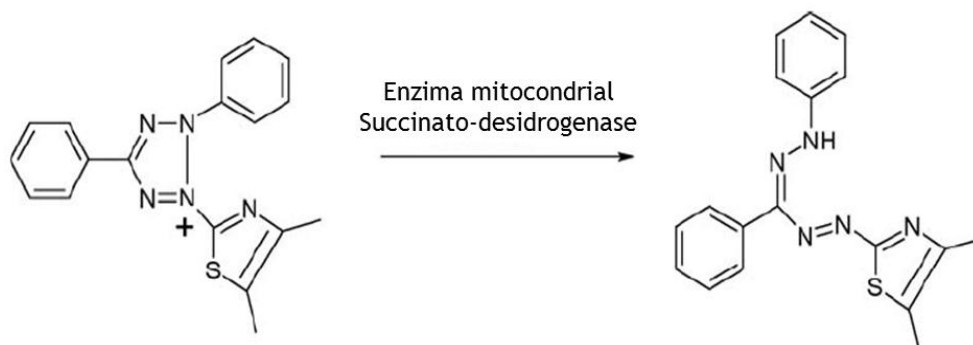


Figura 10- Conversão do sal tetrazolium MTT em formazano (produto corado) pela acção da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase.

#### **A metodologia realizada para o ensaio MTT foi a seguinte:**

Após as linhas celulares serem incubadas com os diferentes compostos durante um determinado período de tempo, os pocetos foram aspirados e aplicou-se uma solução de MTT (com uma concentração de 0,5 mg/mL em PBS). Esta solução esteve em contacto com as células durante 4 horas, numa atmosfera de 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e desprovida de luz.

Após 4 horas de exposição à solução de MTT, aspirou-se o conteúdo existente na placa de *microwells* e foi colocado em cada poceto 200 µL de DMSO e 50 µL de tampão glicina. O DMSO permitiu a solubilização dos cristais de formazano, de forma a obtermos cor, e o tampão glicina permitiu estabilizar a cor obtida. Posteriormente, o conteúdo de cada poceto foi transferido para uma microplaca de 96 *wells*, que foi introduzida no leitor espectrofotométrico de microplacas. A cor desenvolvida foi quantificada a uma densidade óptica de 570 nm.

Foi realizada uma leitura para todos os compostos estudados. Cada uma das concentrações dos compostos em estudo foi testada em triplicado; obtivemos três valores de absorvência para cada concentração estudada, para os quais foi calculada a média e o desvio padrão respectivo.

## **6.2. Citometria de fluxo - Ensaio de marcação de apoptose e morte celular**





A apoptose é um processo fisiológico normal que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e que mantém a homeostase tecidual, sendo um processo antitumoral efectivo e benéfico, desde que remova células danificadas ou com um funcionamento anormal (Ramos, 2007).

É um mecanismo altamente conservativo, caracterizado pela contracção da célula, perda da membrana plasmática, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, facilmente capturados por macrófagos ou pelas células vizinhas, evitando-se a resposta inflamatória nos tecidos circundantes. A perda da membrana plasmática é uma das características iniciais (Khan et al., 2010; Mooney et al., 2002).

Nas células apoptóticas, a membrana fosfolipídica de fosfatidilserina (PS) é translocada do interior para a parte exterior da membrana plasmática, expondo o PS ao ambiente celular externo. A anexina V é conjugada com fluorocromos, incluindo o FITC. Este conjugado apresenta elevada afinidade para o PS, ligando às superfícies fosfolipídicas carregadas negativamente, sendo assim utilizado para uma análise sensível de citometria de fluxo para as células que vão entrar em apoptose. Como a externalização do PS ocorre nos estádios iniciais da apoptose, a anexina V- FITC pode identificar a apoptose em estadios iniciais (Patlolla et al., 2010). A anexina V- FITC é tipicamente usada em conjugação com o iodeto de propídeo (PI).

As células viáveis com membranas intactas excluem o PI, enquanto as membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis ao PI, permitindo ao investigador identificar as células em apoptose inicial (PI negativas e anexina V- FITC positivas). Os resultados podem ser interpretados segundo a tabela abaixo referida (Mooney et al., 2002; Patlolla et al., 2010).

Tabela 3- Interpretação dos resultados da citometria de fluxo. Adaptado de (Mooney et al., 2002).

	Anexina V- FITC 	Anexina V- FITC 
Iodeto de propídeo 	Células efectivamente mortas (necróticas)	Células em apoptose tardia, ou células mortas
Iodeto de propídeo 	Células Viáveis	Células em apoptose inicial

#### A metodologia realizada foi a seguinte:

As linhas celulares em cultura, presentes em caixas de 75 cm<sup>3</sup>, foram incubadas com uma determinada concentração dos compostos de interesse. Passadas 48 horas de incubação, o conteúdo dos frascos de cultura foi aspirado e procedeu-se à tripsinização. O “*pellet*” resultante para cada composto foi ressuspendido em 200 µL de “*Binding Buffer*” e transferido para tubos de ensaio. A cada um dos tubos foi adicionado 5µL de Anexina V- FITC e o conteúdo celular existente foi incubado durante 15 minutos, a 25°C, num ambiente escuro. Passado esse período de tempo, o conteúdo celular foi agitado suavemente no vórtex e realizou-se uma leitura no citómetro de fluxo. Posteriormente foram adicionados a cada tubo de ensaio 10 µL de PI (C=50 µg/mL); os tubos foram agitados suavemente no vórtex e fez-se uma nova leitura no citómetro de fluxo, para obtenção dos resultados.

## 7. Procedimento geral realizado para estudar o efeito dos compostos 17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja e fitoestrogénios da soja na viabilidade celular e na indução da morte celular

### 7.1. Estudo da viabilidade celular

Para cada protocolo foram preparadas 4 placas *multiwells* de 24 pocetos, numa concentração de  $2 \times 10^4$  células/poceto, mantidas em meio de cultura.

Passado um determinado período de tempo, o conteúdo existente em cada poceto foi aspirado e adicionaram-se os compostos pretendidos. A disposição dos compostos nas *placas multiwells* foi a seguinte:

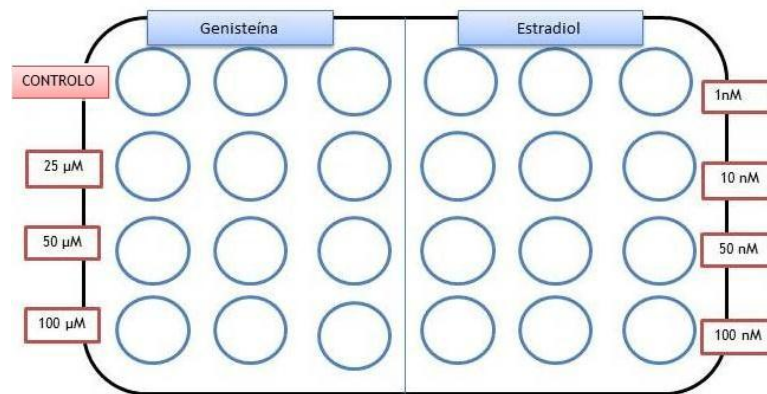


Figura 11- Disposição dos compostos Genisteína e 17- $\beta$ -estradiol numa placa *multiwells* de 24 pocetos.

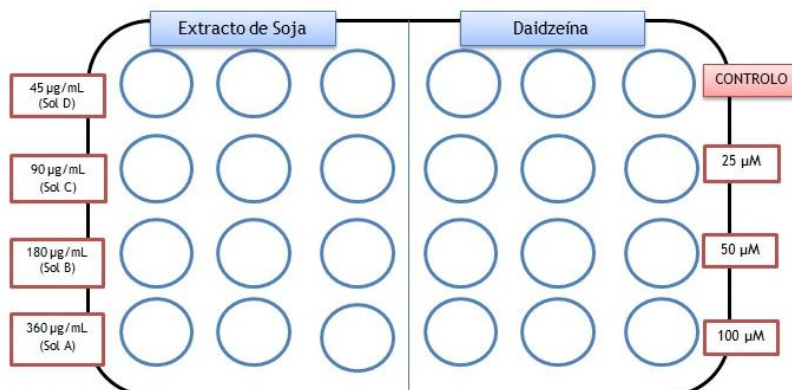


Figura 12- Disposição dos compostos Extracto de Soja e Daidzeína aplicados na placa *multiwells* de 24 pocetos.

Nas 4 placas *multiwells* preparadas, os compostos foram adicionados os da seguinte forma:

- Em 2 das caixas foram aplicados segundo o esquema da figura 11.
- Nas 2 caixas restantes foram aplicados segundo o esquema da figura 12.

Passado um determinado período de tempo, uma das placas com o esquema correspondente à figura 11 e uma das placas com o esquema correspondente à figura 12, escolhidas aleatoriamente, foram sujeitas ao ensaio de viabilidade celular (MTT). Registaram-se os valores de absorvência a 570nm. Após a realização do ensaio do MTT, essas caixas foram descartadas.

Nas 2 placas *multiwells* restantes, o conteúdo existente foi aspirado e foi adicionado meio de cultura, na ausência dos compostos de interesse. Passado um determinado período de tempo, as placas *multiwells* foram sujeitas a um ensaio de viabilidade celular (MTT). Os valores de absorvência a 570 nm registados, correspondendo aos valores (CREC-com recuperação). A recuperação permitiu verificar qual seria a resposta das células, após terem sido submetidas aos produtos em estudo. Após a realização do ensaio do MTT, essas caixas foram descartadas.

Adicionalmente também foi realizado um ensaio com 17- $\beta$ -estradiol comercializado sob a forma de comprimidos e aconselhado para a terapia hormonal de substituição. Para cada ensaio foram preparadas 2 placas *multiwells* e foi seguido o protocolo anteriormente descrito. A disposição das sucessivas diluições do composto em estudo na placa *multiwells* estão demonstradas seguidamente.

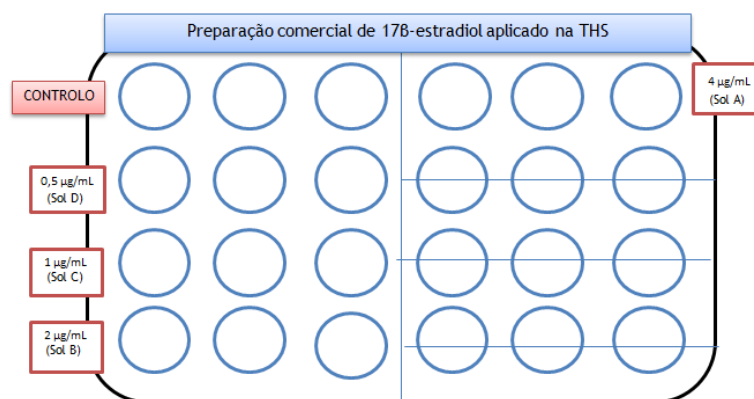


Figura 13- Disposição diferentes diluições de 17- $\beta$ -estradiol comercial usado na terapia hormonal de substituição na placa *multiwells* de 24 poços.

Este procedimento foi aplicado quer na linha celular NHDF, quer na linha celular MCF7. Para todas as concentrações testadas foram realizados ensaios em triplicado.

---

Em cada placa *multiwells* foram testados 3 pocetos controlo (ausência dos compostos de interesse) e a média dos valores de absorvência obtidos para os 3 pocetos, foi considerada como 100% de viabilidade celular.

Ao determinar o valor médio das absorvências, após incubação com os compostos de interesse, (obtidas através do ensaio de viabilidade celular- MTT), este foi considerado relativamente ao controlo, e os valores foram convertidos para percentagem de viabilidade celular relativa.

O ensaio controlo permitiu-nos comparar a viabilidade celular na ausência dos compostos testados, com a presença dos mesmos. Ou seja, permitiu-nos verificar se iria ocorrer um aumento ou uma diminuição da proliferação celular, em relação ao controlo.

Numa fase inicial de optimização de protocolo experimental a utilizar, houve alterações em determinados parâmetros, entre os quais o meio de cultura utilizado (meio de cultura completo ou meio de cultura incompleto) e no tempo de incubação com os compostos de interesse e de recuperação celular. Os parâmetros usados no decorrer deste trabalho serão justificados e explicitados no decorrer da tese.

## 7.2. Estudo de marcação da apoptose e da morte celular

Para se determinar em que estado estavam as células, quando sujeitas a determinadas concentrações de compostos, realizou-se uma análise por citometria de fluxo.

Para tal, foram preparados 5 frascos de cultura de 75 cm<sup>3</sup>, com igual número de células, e passadas 48 a 72 horas foram aplicados os compostos de interesse nas concentrações requeridas para estudar. Foi seleccionada uma concentração intermédia para cada composto (tabela 4).

Tabela 4- Concentrações dos compostos de interesse, aplicadas na análise por citometria de fluxo.

Composto testado	17-B-estradiol	Extracto de Soja	Genisteína	Daidzeína	Controlo
Concentração de compostos	50 nM	90 µg/mL (solução C)	50 µM	50 µM	Meio de cultura completo

Passadas 48 horas de incubação com os compostos em estudo, procedeu-se à análise por citometria de fluxo, para as MCF7 e para as NHDF.

---

## 8. Justificação das concentrações aplicadas nos ensaios

Nesta dissertação de mestrado foram testados o 17- $\beta$ -estradiol, fitoestrogénios da soja (daidzeína e genisteína) e duas preparações comerciais distintas, aconselhadas na terapia hormonal de substituição: 17- $\beta$ -estradiol sob a forma de comprimidos e extracto de soja na forma de cápsulas. Todos os compostos foram testados em fibroblastos da derme humana saudáveis (NHDF) e em células epiteliais cancerígenas (MCF7).

A tabela abaixo representa as concentrações das preparações comerciais que estiveram em contacto com as células.

Tabela 5- Equivalência de concentrações para os compostos comerciais testados

Diluições	1 cápsula (180mg extracto de soja)		1 comprimido THS (2mg 17- $\beta$ -estradiol)	
	C Extracto de soja em contacto com as células	C em daidzeína*	C (THS)	C em 17- $\beta$ - estradiol
Solução A	360 $\mu\text{g/mL}$	43,2 $\mu\text{M}$	4,0 $\mu\text{g/mL}$	108,94 nM
Solução B	180 $\mu\text{g/mL}$	21,7 $\mu\text{M}$	2,0 $\mu\text{g/mL}$	54,40 nM
Solução C	90 $\mu\text{g/mL}$	10,8 $\mu\text{M}$	1,0 $\mu\text{g/mL}$	27,23 nM
Solução D	45 $\mu\text{g/mL}$	5,4 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	13,61 nM

\*Em cada cápsula com 180 mg de extracto de soja, 5,5 mg correspondem a daidzeína.

Como são recomendados diariamente para a sintomatologia da menopausa 1 comprimido de THS ou 1 cápsula de extracto de soja, podemos afirmar que há uma analogia entre as concentrações.

As concentrações de 17- $\beta$ -estradiol estudadas foram 100 nM, 50 nM, 10 nM e 1 nM. Esta escolha baseou-se no facto de as concentrações serem já utilizadas em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de investigação no qual este projecto se insere, e também utilizadas por outros investigadores (Chow et al., 2004).

As concentrações usadas dos fitoestrogénios daidzeína e genisteína foram de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Estas já foram alvo de estudos por diversos autores (Di Virgilio et al., 2004; Jin et al., 2010; Nobert et al., 2006).

---

## 9. Análise estatística

Todos os resultados apresentados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, e para a análise dos mesmos foi utilizado o Microsoft Office Excel 2010®, aplicando o teste estatístico *t-student*. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo  $p < 0,05$ .

O teste t-student foi aplicado para comparar os resultados de 3 formas distintas:

- Comparação entre a resposta de viabilidade celular obtida pelo controlo e pelos compostos de interesse;
- Comparação da viabilidade celular obtida pelas mesmas concentrações de compostos em diferentes protocolos;
- Comparação da viabilidade celular em linhas celulares diferentes.

Foi também aplicado uma teoria matemática que nos permitiu verificar se haviam diferenças significativas entre o Quociente ( $Q = \text{CREC}/48\text{H}$ ) de um determinado composto e o Quociente do controlo. Para tal foram calculados 2 parâmetros distintos: o desvio padrão do quociente e a diferença do desvio.

**Desvio Padrão do Quociente:**

$$\sigma_Q = \frac{x_1}{x_2} \cdot \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{x_1^2} + \frac{\sigma_2^2}{x_2^2}} \quad (1)$$

Onde:

- $\sigma_Q$ - Desvio padrão do quociente
  - $x_1$ - Absorvência relativa CREC
  - $x_2$ - Absorvência relativa 48h
  - $\sigma_1^2$ - Valor do desvio padrão CREC elevado ao quadrado
  - $\sigma_2^2$ - Valor do desvio padrão às 48h elevado ao quadrado
  - $x_1^2$ - Valor percentual obtido CREC elevado ao quadrado
  - $x_2^2$ - Valor percentual obtido às 48h elevado ao quadrado
- $\left. \begin{array}{l} \text{• } x_1 \text{- Absorvência relativa CREC} \\ \text{• } x_2 \text{- Absorvência relativa 48h} \end{array} \right\} \frac{x_1}{x_2} = Q \quad (2)$

---

**Diferença do desvio** - Permitiu-nos verificar se haviam diferenças entre o Q obtido para um composto com uma determinada concentração e o Q obtido para o controlo. Ou seja, permitiu-nos verificar se a variação do Q para o controlo seria ou não diferente do Q obtido para uma determinada concentração de composto.

Para tal aplicamos a seguinte fórmula:

$$\sigma_{dif} = \sqrt{\sigma_{QCx}^2 + \sigma_{QB}^2} \quad (3)$$

Onde:

- $\sigma_{dif}$  -Diferença entre a viabilidade celular relativa do controlo e a viabilidade celular relativa de um composto com uma determinada concentração
- $\sigma_{QCx}^2$  -Valor do desvio padrão associado ao quociente, para uma determinada concentração, elevado ao quadrado
- $\sigma_{QB}^2$  - Valor do desvio padrão associado ao quociente para o controlo, elevado ao quadrado

Obtendo o  $\sigma_{dif}$ , eram calculados os intervalos existentes através da seguinte fórmula:

$$(Q_{Cx} - Q_B) - \sigma_{dif} \leq (Q_{Cx} - Q_B) \leq (Q_{Cx} - Q_B) + \sigma_{dif} \quad (4)$$

Se o valor 0 estivesse incluído no intervalo calculado, não podíamos afirmar que haviam diferenças significativas entre os Q do controlo e os Q de uma determinada concentração dos compostos de interesse.

---

# Escolha e optimização do protocolo experimental

Na literatura estão descritos diversos protocolos experimentais utilizados em ensaios *in vitro* com culturas celulares. O grupo de investigação do CICS no qual este projecto se insere, tem aplicado diferentes protocolos nos vários projectos de investigação que desenvolve. Para executar a parte experimental do trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado, foi necessário eleger o protocolo mais adequado aos nossos objectivos.

## 1. Constituição do meio de cultura

Foram seleccionados 3 protocolos distintos, através de um consenso obtido entre diversos investigadores pertencentes ao grupo de trabalho (esquema 2). Estes protocolos foram aplicados numa linha celular de fibroblastos saudáveis da derme humana (NHDF), com a finalidade de reconhecer qual seria o mais adequado a empregar no trabalho experimental subsequente. A principal diferença entre eles, encontra-se na suplementação do meio de cultura com FBS (*Fetal Bovine Serum*) em determinadas fases do protocolo. A formulação base é sempre constituída por meio de cultura RPMI-1640 (ver preparação do mesmo no “Material e Metodologia”), meio este habitualmente recomendado para culturas de fibroblastos humanos (Sigma-Aldrich, 2011). Numa 1ª fase, todas as placas foram preparadas com meio de cultura RPMI suplementado com FBS (esquema 2). Nas duas fases subsequentes, os suplementos aplicados sobre o meio RPMI foram os seguintes:

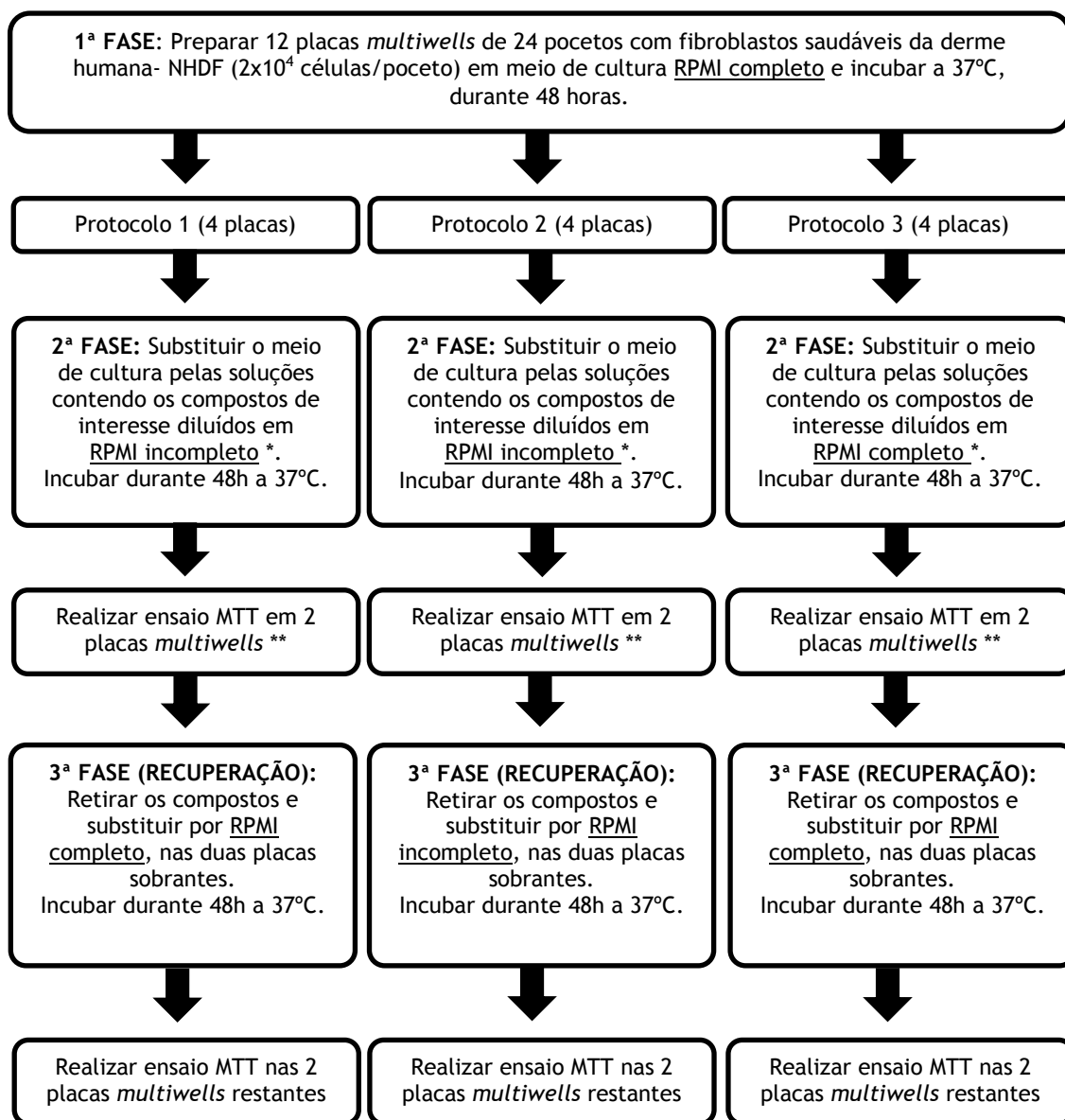
- Protocolo 1: 2ª fase - Sem suplemento com FBS; 3ª fase - Suplemento com FBS a 10% (v/v);
- Protocolo 2: 2ª e 3ª fase- Sem suplemento com FBS;
- Protocolo 3: 2ª e 3ª fase- Suplemento com FBS a 10% (v/v).

O meio de cultura RPMI-1640 contendo FBS foi denominado de RPMI completo e quando era desprovido de FBS designou-se de RPMI incompleto.

O FBS apresenta uma importância vital para os ensaios *in vitro*. A capacidade para estimular o crescimento e o metabolismo é essencial para a obtenção de resultados. Este soro tem sido utilizado na suplementação dos meios de cultura que utilizam células animais ou humanas (Brunner et al., 2010; Gstraunthaler, 2003). Na maioria dos casos é usado em concentrações de 10% (v/v), concentração aplicada nos protocolos utilizados. O FBS contém factores hormonais e outros factores de crescimento que estimulam, entre outros parâmetros, a proliferação celular, providenciam componentes para a matriz extracelular e permitem uma

redução do tempo de optimização de uma formulação de meio de cultura para cada tipo de célula (Gstraunthaler, 2003). Contudo, o FBS possui algumas desvantagens, podendo introduzir variáveis quantitativas e qualitativas nos resultados (Brunner et al., 2010).

Um dos parâmetros utilizados para a escolha de um protocolo foi a viabilidade celular relativa obtida. O estudo da viabilidade celular relativa foi efectuado através do ensaio de MTT.



Esquema 2: Representação dos protocolos aplicados ao estudo da viabilidade celular em NHDF após 48 horas de incubação com os compostos 17- $\beta$  estradiol, genisteína, daidzeína e extracto de soja (diluídos em meios de cultura RPMI completo ou RPMI incompleto), e após recuperação.

\* Cada protocolo implica a preparação de 4 placas *multiwells* que foram divididas em pares. Cada par foi posteriormente incubado com os compostos de interesse, segundo a disposição das figuras 11 e 12 (ver “Material e Metodologia”);

\*\* Uma placa de cada par, escolhida aleatoriamente, foi submetida ao ensaio MTT.

Os resultados obtidos para os controlos estão representados na figura 14.

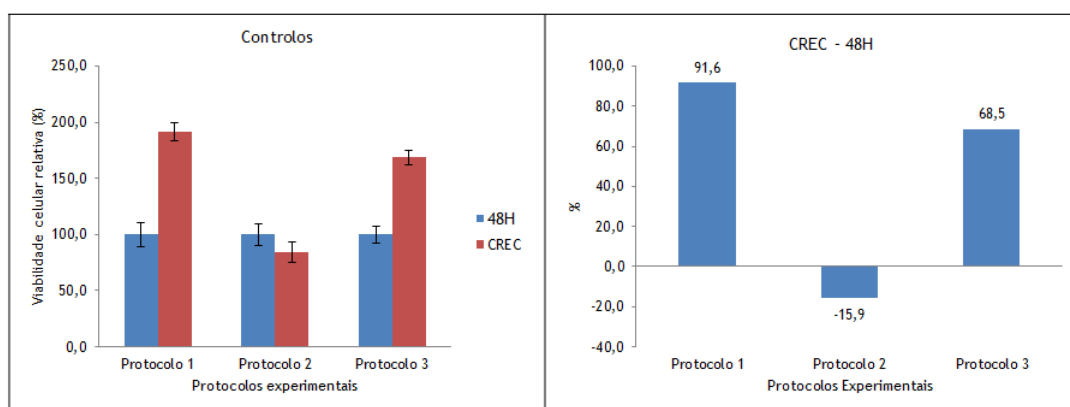


Figura 14- Gráficos representativos dos resultados obtidos na aplicação dos protocolos 1, 2 e 3 para os ensaios controlo (compostos de interesse ausentes). Gráfico da esquerda: Viabilidade celular relativa observada às 48 horas (48H) versus viabilidade celular relativa observada após recuperação (CREC) para cada um dos protocolos estudados. Gráfico da direita: Representação gráfica das diferenças observadas no gráfico da esquerda.

O protocolo 1 permitiu observar um aumento da viabilidade celular relativa após a recuperação dos controlos, tendo-se observado uma recuperação superior (mais 23,1%), em relação à obtida quando aplicado o protocolo 3. A privação de FBS na 2ª fase do protocolo 1 parece ter induzido nas células um aumento da sensibilidade aos esteróides contidos no FBS, levando a uma recuperação posterior muito acentuada. Este resultado está de acordo com as experiências realizadas por Santen e colaboradores, nas quais se verificou que a ausência de esteróides aumentava a sensibilização aos mesmos. Alguns mecanismos estão associados com esta resposta incluindo o aumento dos níveis de ER $\alpha$  de 4 a 10 vezes durante a privação de esteróides a longo prazo. O desenvolvimento de hipersensibilidade pode envolver também a modulação dos efeitos genómicos dos esteróides, actuando na transcrição e acções não genómicas envolvendo os receptores de membrana (Santen et al., 2008).

Com a aplicação do protocolo 2, no qual foi usado RPMI incompleto na 2ª e na 3ª fase, registou-se um decréscimo na viabilidade celular após recuperação, reflectindo a ausência dos factores de crescimento e dos esteróides contidos no FBS. Segundo Bettuzi e colaboradores, a privação de FBS torna os fibroblastos quiescentes, que pode resultar numa diminuição da actividade mitocondrial detectada pelo ensaio MTT, o que parece estar de acordo com os resultados obtidos (Bettuzzi et al., 1999).

Os resultados obtidos, aplicando os compostos de interesse (17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja, genisteína e daidzeína) aos 3 protocolos, podem ser observados na figura 15.

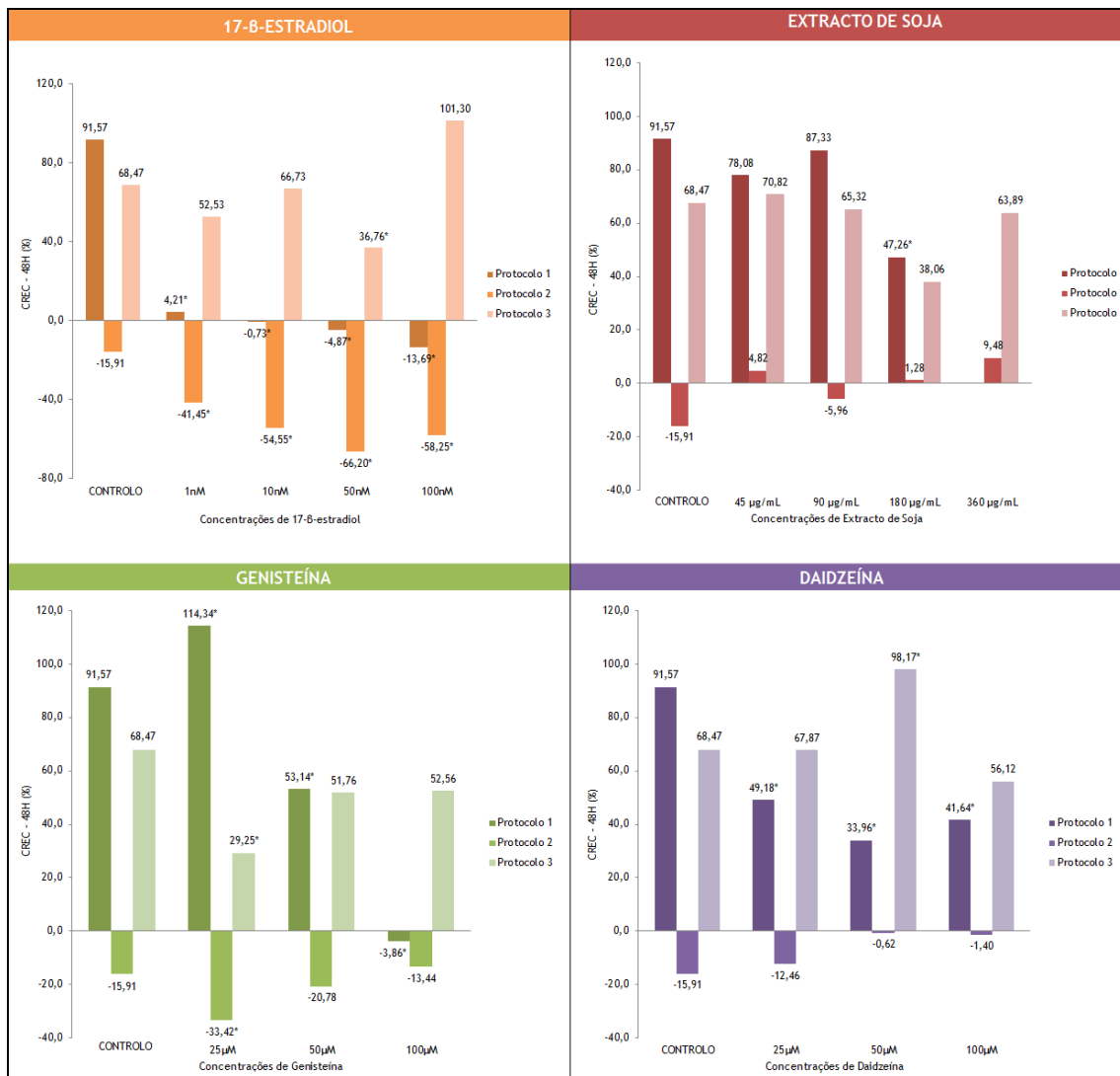


Figura 15- Representação gráfica das diferenças entre viabilidade celular relativa, após recuperação e após 48 h de incubação com os compostos de interesse, aplicando os protocolos em estudo. Os valores assinalados com \* apresentam diferenças significativas relativamente aos resultados obtidos pelo ensaio controlo, obtidas através da aplicação da teoria matemática explicitada no “Material e Metodologia” (Ponto 9- Análise Estatística).

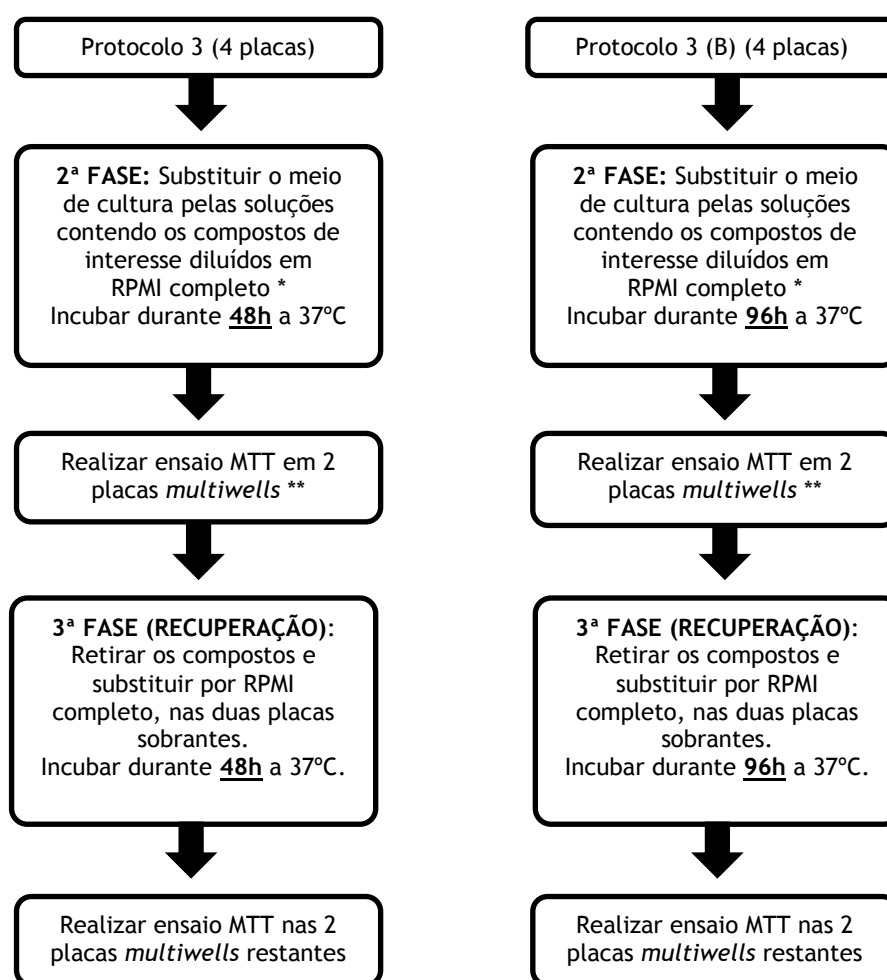
A aplicação do protocolo 1 permite observar que existe uma variabilidade considerável na resposta celular. Apesar de o ensaio com daidzeína e com o extracto de soja ter apresentado um aumento da viabilidade celular relativa após recuperação para todas as concentrações, o mesmo não ocorreu para os restantes 2 compostos (genisteína e 17-B-estradiol). A aplicação do protocolo 2, tem com consequência a diminuição da viabilidade celular após recuperação, para praticamente todas as concentrações estudadas dos compostos. Esta situação poderá advir da ausência de factores de crescimento e esteróides proveniente do FBS, no meio de cultura, e do facto desta privação tornar os fibroblastos quiescentes, à semelhança do que ocorreu no ensaio controlo.

Sendo assim, o protocolo 3 parece ser o protocolo mais correcto e menos sujeito a interferências, e foi por isso o protocolo escolhido para efectuar os ensaios deste trabalho.

## 2. Determinação dos intervalos de tempo ideais para incubação com os compostos e na recuperação

Para determinar qual o intervalo de tempo ideal para incubação com os compostos e para recuperação, aplicámos dois tempos pré-definidos: 48H e 96H. Para tal, tivemos em consideração, que o tempo necessário para o número de células iniciais de uma cultura de NHDF duplicar, é de aproximadamente 40 horas, segundo estudos anteriores realizados pelo grupo de investigação.

A metodologia seguida está representada no esquema 3. A 1ª fase deste protocolo consistiu na aplicação da 1ª fase do esquema 2.



Esquema 3: Representação da metodologia seguida para estudar a viabilidade celular de NHDF após 48 e 96 horas de incubação com os compostos 17-B-estradiol, extracto de soja, genisteína e daidzeína, e após recuperação, durante 48 ou 96 horas (Protocolo 3 e 3(B)).

\* Cada protocolo implica a preparação de 4 placas *multiwells* que foram divididas em pares. Cada par foi posteriormente incubado com os compostos de interesse, segundo a disposição das figuras 12 e 13 (ver “Material e Metodologia”);

\*\* Uma placa de cada par, escolhida aleatoriamente, foi submetida ao ensaio MTT.

Os resultados obtidos para este ensaio estão representados na figura 16.

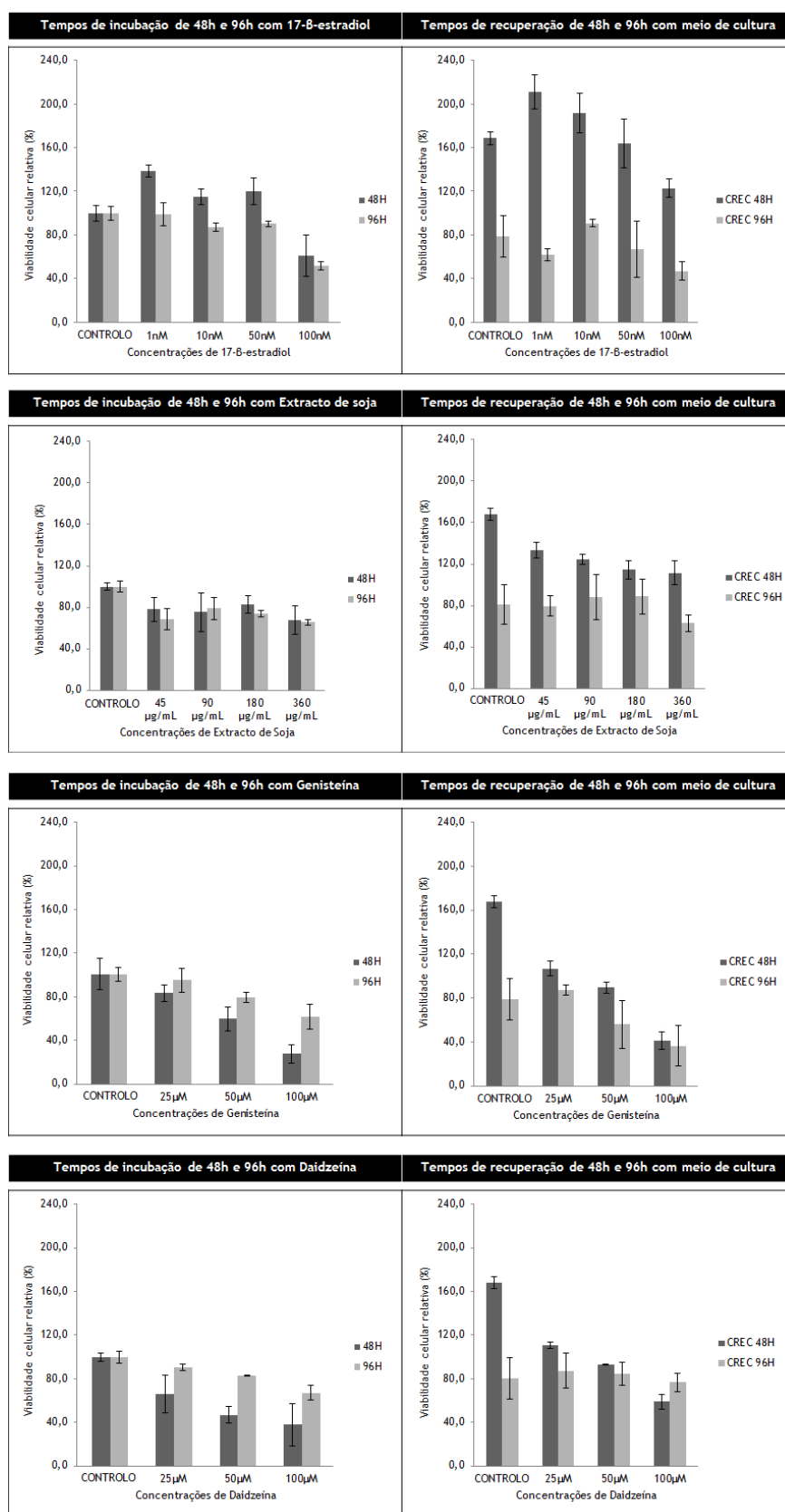


Figura 16- Os gráficos da esquerda mostram os resultados obtidos para a viabilidade celular relativa após 48 e 96 horas de incubação. Os gráficos da direita mostram os resultados obtidos para a recuperação celular de 48H e de 96H (CREC).

Para analisar os resultados obtidos para uma mesma concentração, aplicou-se o teste estatístico *t-student*. Compararam-se os tempos de incubação de 48h com os de 96h, e os tempos de recuperação às 48h e às 96h. Os resultados desta análise estão descritos na tabela 6.

Tabela 6- Análise dos resultados obtidos para os tempos de incubação e recuperação às 48 e 96 horas, Aplicação do teste *t-student* ( $p < 0,05$ ); são consideradas diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (S)

	Análise dos resultados obtidos para as 48h e 96h de incubação		Análise dos resultados obtidos para as 48h e 96h de recuperação	
	<i>t-student</i> (p)	Sig. estatístico	<i>t-student</i> (p)	Sig. Estatístico
<i>17-B Estradiol</i>				
Controlo	1,000	-	0,014	S
1 nM	0,059	-	0,009	S
10 nM	0,036	S	0,006	S
50 nM	0,095	-	0,060	-
100 nM	0,631	-	0,022	S
<i>Extracto de soja</i>				
Controlo	1,000	-	0,007	S
45 µg/mL	0,098	-	0,006	S
90 µg/mL	0,541	-	0,031	S
180 µg/mL	0,114	-	0,202	-
360 µg/mL	0,379	-	0,020	S
<i>Genisteína</i>				
Controlo	1,000	-	0,008	S
25 µM	0,218	-	0,089	-
50 µM	0,035	S	0,140	-
100 µM	0,037	S	0,625	-
<i>Daidzeína</i>				
Controlo	1,000	-	0,019	S
25 µM	0,082	-	0,221	-
50 µM	0,017	S	0,276	-
100 µM	0,104	-	0,031	S

Após análise da tabela 6, demonstrou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para as 48 h e 96 h de incubação e após 48h e 96h de recuperação. Contudo, estas não são extensíveis a todas as concentrações, nem a todos os compostos estudados. Apresentam-se mais proeminentes quando comparados os tempos de recuperação.

Assim, podemos afirmar que a extensão do tempo de incubação com os compostos de 48 horas para 96 horas apenas apresenta diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular das concentrações 10nM de 17-B-estradiol, 50 e 100µM de genisteína e 50 µM de daidzeína. Quando analisamos os tempos de recuperação verifica-se um maior número de diferenças estatisticamente significativas, principalmente para o 17-B-estradiol e para o extracto de soja.

As diferenças registadas na viabilidade celular após a recuperação com os 2 protocolos podem ter várias causas inerentes. Uma hipótese para as diferenças registadas poderá advir da

---

impossibilidade de crescimento celular, devido à área de aderência disponível nos pocetos ser limitada, factor determinante para um tempo de estudo de 96h. Estes resultados estão de acordo com trabalhos efectuados por Freshney e colaboradores, que verificaram que quando há um número elevado de células em cultura, estas permanecem numa fase estacionária, fase *plateau*, onde a fracção de crescimento se aproxima de zero e eventualmente ocorre paragem do ciclo celular (Freshney, 2006). Esta diminuição de área disponível levou a um decréscimo da velocidade de crescimento quando as células alcançaram a confluência, através da inibição de contacto (InvitrogenLifeSciences, 2011).

Após analisar os resultados obtidos, o protocolo 3 foi considerado cientificamente mais correcto, já que possibilita uma proliferação apenas dependente dos mecanismos celulares, sem dificuldades relacionadas com factores externos, tais como o espaço disponível.

---

# Resultados experimentais e discussão

Os estudos da resposta das linhas celulares NHDF e MCF7 aos compostos de interesse foram realizados com tempos de incubação e de recuperação de 48 horas e com meios de cultura adequados (RPMI completo/NHDF ou DMEM completo/MCF7).

Passamos a analisar os resultados obtidos para o estudo de viabilidade celular e para os estudos de indução da apoptose.

## 1. Estudos de viabilidade celular

### 1.1. Estudos nas células NHDF

Os trabalhos desenvolvidos por Haczynski et al provaram que as NHDF tinham ER, razão pela qual as podemos utilizar como modelo de estudo para compostos estrogénicos (Haczynski et al., 2002). Existem poucos estudos experimentais que utilizem as NHDF como modelo, contudo é de nosso interesse aplicá-lo, tendo vindo a ser validado pelo grupo de investigação no qual este projecto se insere.

Os resultados obtidos para as 48 horas de incubação com os compostos de interesse, e respectiva recuperação, estão representados na figura 17.

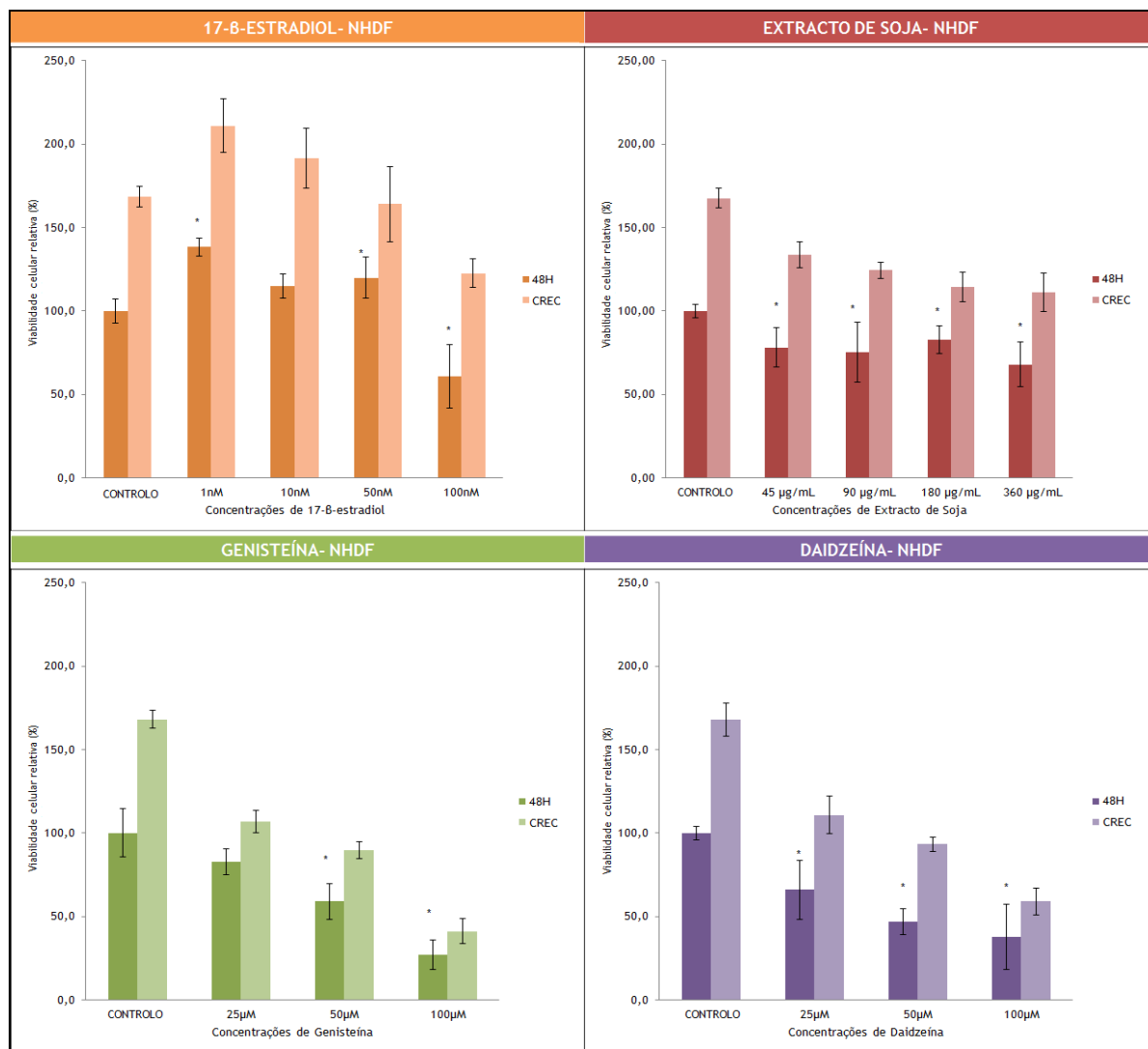


Figura 17- Gráficos dos efeitos do 17-β-estradiol, do extracto de soja e dos fitoestrogénios (genisteína e daidzeína) na linha celular NHDF. Os efeitos estudados foram a viabilidade celular relativa: após 48 horas (48H) de incubação com os compostos e após recuperação (CREC). \* - Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa para o controlo e um determinado composto, após 48 de incubação - aplicação do teste estatístico t-student ( $p < 0,05$ ).

Para uma mais fácil interpretação dos resultados obtidos, após 48 horas de incubação com os compostos de interesse, apresentamos uma tabela complementar (tabela 7), que resume os aspectos mais significativos desta análise.

Tabela 7- Resumo dos resultados obtidos nas células NHDF após 48 horas de incubação com os compostos estudados. Aplicação do teste *t-student* para análise estatística; são consideradas diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (S).

Composto estudado	Concentração	Resultado	Teste <i>t-student</i> (p)	
<i>17-B-Estradiol</i>	1 nM	↑ viabilidade celular	0,0429	S
	10 nM	-	0,1626	-
	50 nM	↑ viabilidade celular	0,0368	S
	100 nM	↓ viabilidade celular	0,0476	S
<i>Extracto de soja</i>	45 µg/mL	↓ viabilidade celular	0,0239	S
	90 µg/mL	↓ viabilidade celular	0,0481	S
	180 µg/mL	↓ viabilidade celular	0,0125	S
	360 µg/mL	↓ viabilidade celular	0,0169	S
<i>Genisteína</i>	25 µM	-	0,2361	-
	50 µM	↓ viabilidade celular	0,0231	S
	100 µM	↓ viabilidade celular	0,0229	S
<i>Daidzeína</i>	25 µM	↓ viabilidade celular	0,0119	S
	50 µM	↓ viabilidade celular	0,0009	S
	100 µM	↓ viabilidade celular	0,0101	S

Podemos afirmar que a maioria das concentrações testadas levou a uma diminuição da viabilidade celular. No entanto, para as concentrações 1 nM e 50 nM de 17-B-estradiol registou-se um aumento da viabilidade celular dos fibroblastos, e para as concentrações 10nM de 17-B-estradiol e 25 µM de genisteína, não se verificaram efeitos estatisticamente significativos.

Os resultados obtidos para concentrações de 1 e 50 nM 17-B-estradiol, parecem estar de acordo com os efeitos mitogénicos observados por Celojevic e colaboradores, no estudo que efectuaram em células epiteliais oculares humanas (Celojevic et al., 2011).

A viabilidade celular associada à genisteína e à daidzeína diminui proporcionalmente ao aumento da concentração. Esta resposta está de acordo com estudos anteriores efectuados por Rucinka e colaboradores e Di Virgílio e colaboradores. O grupo de Rucinka testou concentrações de genisteína entre 0-90µM em fibroblastos do rato e concluíram que concentrações superiores a 20 µM, reduzem significativamente a viabilidade celular, causando mudanças morfológicas e induzindo apoptose e necrose (Rucinska et al., 2008). O trabalho desenvolvido por Di Virgílio e colaboradores em fibroblastos do pulmão de hamsters chineses com daidzeína e genisteína permitiu-lhes concluir que estes apresentavam propriedades citotóxica, *in vitro*, em concentrações superiores a 25 µM (Di Virgilio et al., 2004).

São praticamente inexistentes os trabalhos publicados que estabeleçam uma relação entre os efeitos do extracto de soja na viabilidade celular em fibroblastos humanos.

No seguimento do protocolo 3, procederam-se a ensaios de recuperação celular (3ª fase). Estes ensaios permitiram verificar se após a exposição a um determinado composto, as células conseguiriam recuperar. A avaliação da recuperação é efectuada por ensaios de viabilidade celular (MTT). Na figura 5 podemos observar a percentagem de recuperação celular entre a 2ª e a 3ª fase do protocolo aplicado.

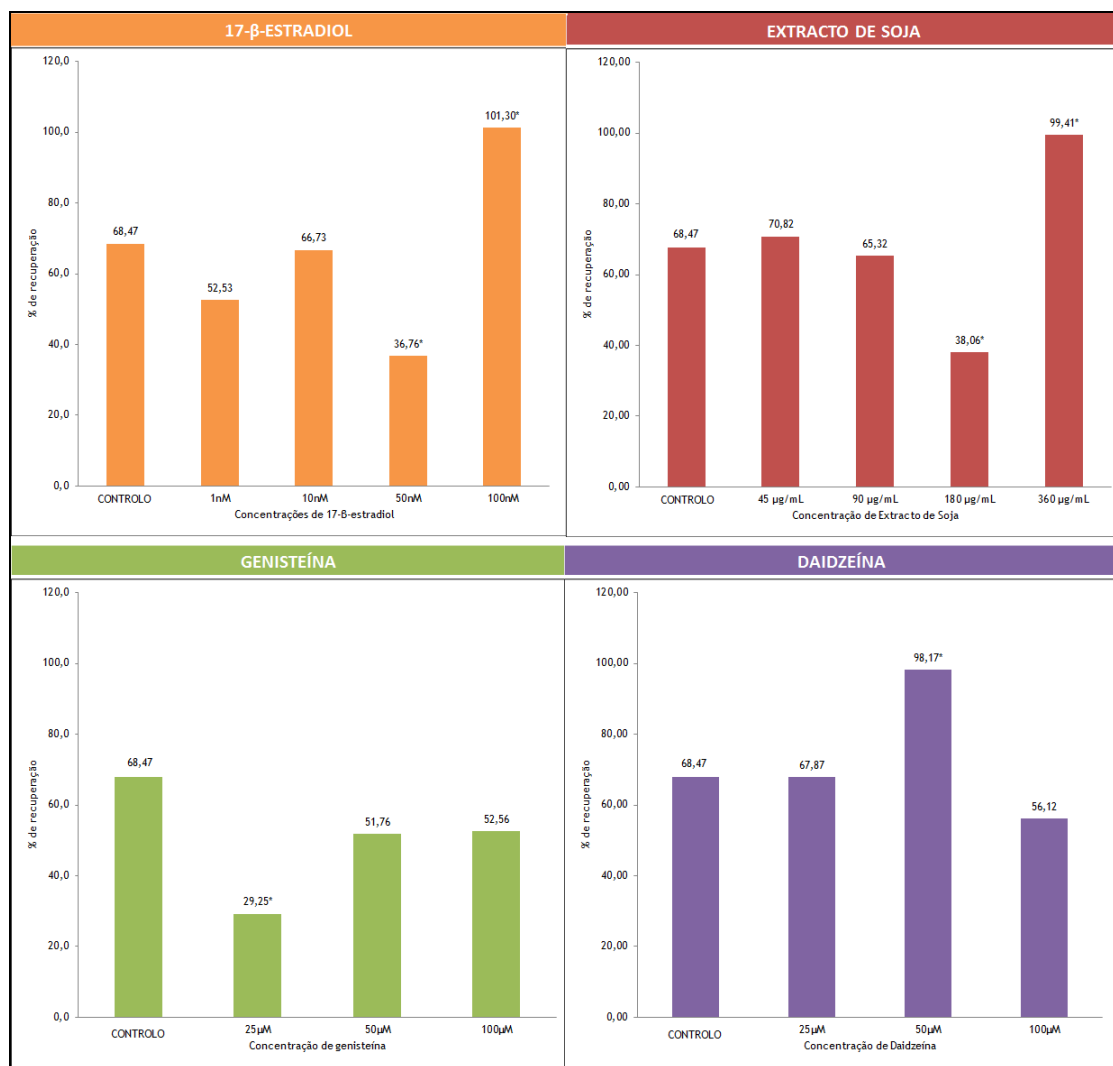


Figura 18- Representação gráfica da percentagem de recuperação celular para as NHDF. As colunas assinaladas com \* apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo. Aplicação da teoria matemática explicitada no “Material e Metodologia” (Ponto 9- Análise Estatística).

Pode-se verificar que ocorre recuperação celular em todos os compostos testados. Qualquer acção citotóxica verificada nas primeiras 48 horas de incubação com os compostos foi reversível.

Para o 17-β-estradiol podemos afirmar que em concentrações mais baixas (1nM e 10nM), a percentagem de recuperação é semelhante à do controlo. No entanto, para a concentração de 50nM, esta razão de crescimento é significativamente menor e para a concentração mais elevada (100 nM), há um aumento significativo da percentagem de recuperação. No caso do

---

extracto de soja, há diferenças significativas para a concentração de 180µg/mL (em que ocorre uma diminuição relativamente ao controlo) e para a concentração mais elevada, 360µg/mL (em que ocorre uma maior taxa de recuperação). Nas restantes concentrações não se verificam diferenças significativas. A genisteína apresenta uma diminuição significativa na recuperação celular para 25µM. Nas restantes concentrações não se verificam diferenças significativas. Para a daidzeína ocorre um aumento da recuperação para a concentração intermédia de 50µM, não havendo registo de diferenças significativas para as restantes concentrações.

Parece haver um paralelismo entre os resultados obtidos para o 17-β-estradiol, extracto de soja e daidzeína. Para a genisteína, apesar de haver uma recuperação positiva, esta é menor que qualquer um dos outros 3 compostos. Estes resultados suscitam a hipótese de que os efeitos observados pela acção do extracto de soja possam estar associados, fundamentalmente, à componente daidzeína.

Com o objectivo de poder estabelecer uma correspondência mais exacta, vamos analisar em seguida os resultados obtidos, apenas para as concentrações que sabemos ser equivalentes.

### **Comparação da viabilidade celular obtida com o extracto de soja e a daidzeína em NHDF**

O extracto de soja comercial estudado apresentava 5,5 mg da isoflavona daidzeína por cápsula. Foram calculadas as concentrações de daidzeína existentes em cada concentração de extracto de soja testada. As equivalências estão referidas na tabela seguinte.

Tabela 8 - Equivalências entre as concentrações de extracto de soja e de daidzeína. C - concentração.

Designação da concentração	Extracto de Soja	C de daidzeína no extracto de soja	C de daidzeína comercial testada
B	180 µg/mL	21,7 µM	25 µM
A	360 µg/mL	43,4 µM	50 µM

As concentrações análogas eram semelhantes às concentrações de daidzeína comercial anteriormente testadas (25 e 50 µM). O gráfico seguinte representa os resultados obtidos nas concentrações análogas de soja e de daidzeína.

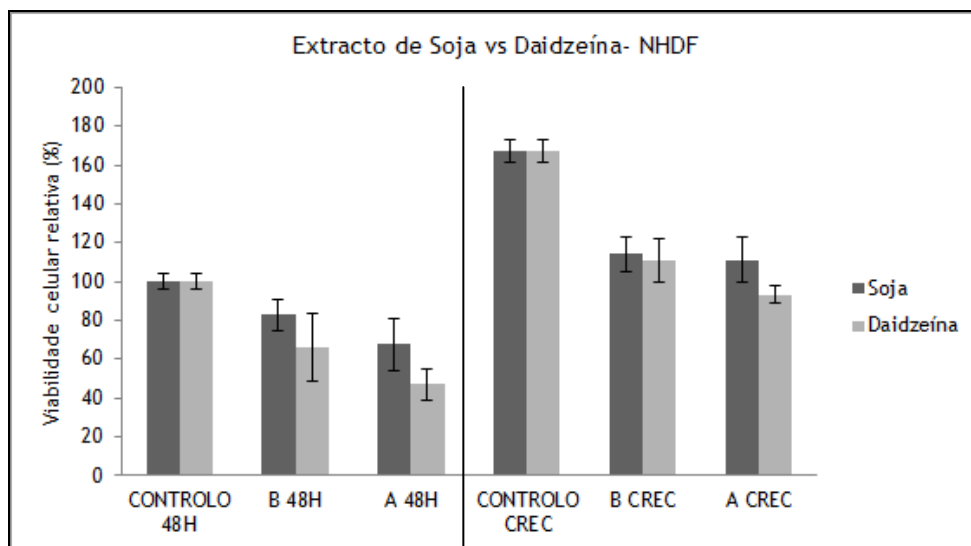


Gráfico 1 - Representação da viabilidade celular de concentrações análogas de extracto de soja e de daidzeína. As concentrações equivalentes estão referenciadas na tabela 8. 48H- incubação durante 48 horas. CREC- Recuperação celular com meio de cultura. B- Concentração mais baixa; A- Concentração mais elevada.

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as respostas obtidas pela daidzeína e pelo extracto de soja, foi aplicado o teste *t-student*. Os resultados obtidos para os valores de *p* calculados estão na tabela seguinte.

Tabela 9- Comparação das respostas obtidas pela daidzeína e pelo extracto de soja em NHDF, através da análise estatística, usando o teste *t-student* ( $p < 0,05$ ).

	Comparação daidzeína vs extracto de soja após 48h de incubação (48H)		Comparação daidzeína vs extracto de soja, após recuperação (CREC)	
	<i>t-student</i> ( <i>p</i> )	Sig. estatístico	<i>t-student</i> ( <i>p</i> )	Sig. Estatístico
Controlo	1,000	-	1,000	-
B	0,230	-	0,852	-
A	0,435	-	0,160	-

Não houve diferenças estatisticamente significativas para as 2 concentrações testadas, quer após incubação com os compostos daidzeína e extracto de soja, quer após recuperação com meio de cultura.

Podemos tirar a ilação de que a resposta obtida pelo extracto de soja poderá ser devida ao componente daidzeína. O conteúdo em genisteína (outra isoflavona major na soja) não estava quantificado na cápsula de extracto de soja testada. Não foi possível comparar a resposta na viabilidade celular, desta isoflavona com o extracto de soja, dada a impossibilidade de calcular a equivalência das concentrações.

## 1.2. Estudos nas células MCF7

As MCF7 são uma linha celular de células epiteliais de cancro da mama e está bem provado que possuem ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Papoutsis et al., 2009). À semelhança da linha celular NHDF, foram realizados ensaios de viabilidade celular após 48 horas de incubação com os compostos e após a respectiva recuperação. Os resultados obtidos estão representados na figura 19.

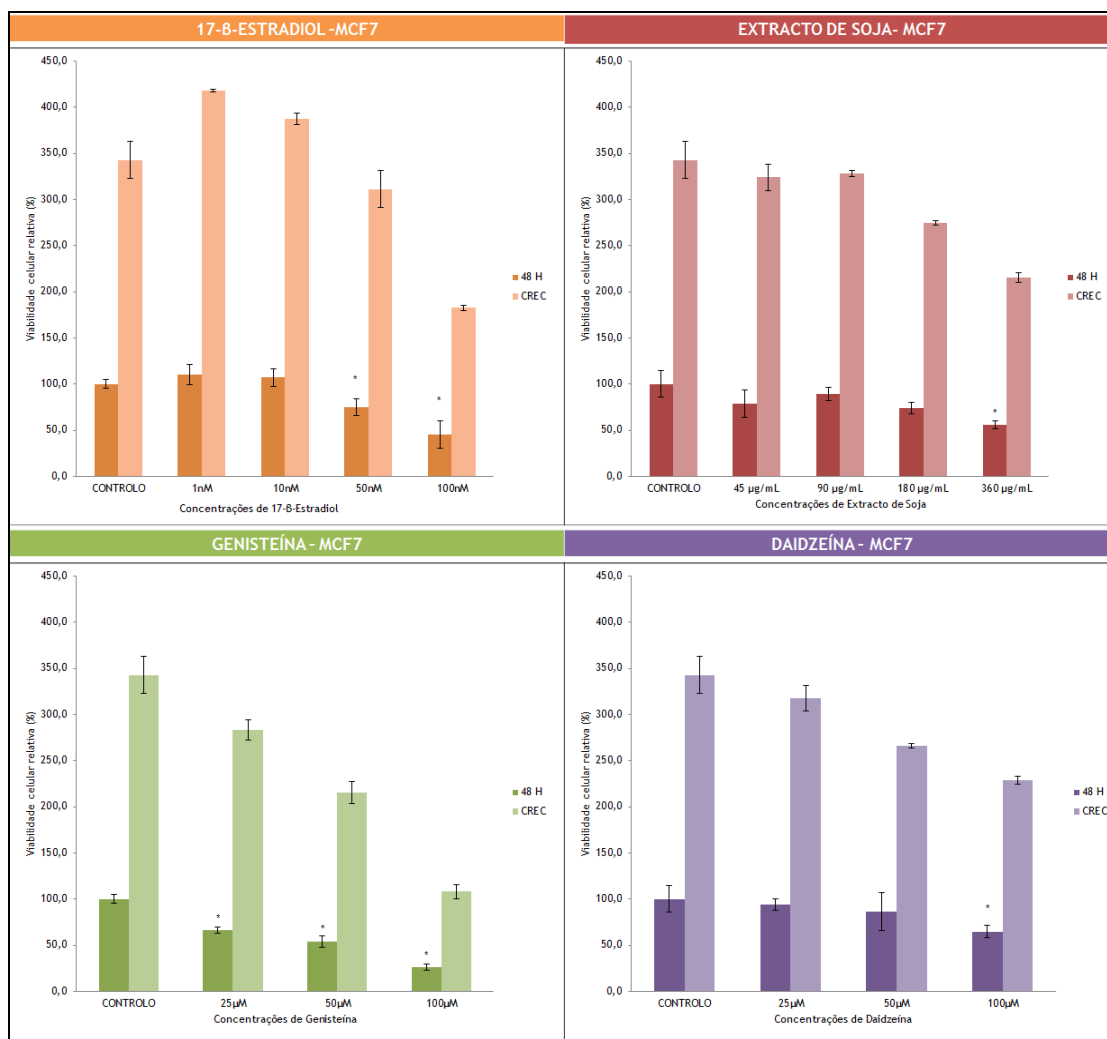


Figura 19- Gráficos dos efeitos do 17-B-estradiol, do extracto de soja, dos fitoestrogénios (genisteína e daidzeína) na linha celular MCF7. Os efeitos estudados foram a viabilidade celular relativa: após 48 horas (48H) de incubação com os compostos e após recuperação (CREC). \* - Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação - aplicação do teste t student ( $p < 0,05$ ).

Para uma mais fácil interpretação dos gráficos da figura 19, relativamente aos resultados obtidos após 48 horas da incubação com os compostos de interesse, apresentamos uma tabela complementar (tabela 10). A tabela 10 resume os aspectos mais significativos desta análise.

Tabela 10- Resumo dos resultados obtidos nas células MCF7 após 48 horas de incubação com os compostos estudados. Aplicação do teste *t-student* para análise estatística dos resultados; são consideradas diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (S).

Composto estudado	Concentração	Resultado	Teste <i>t-student</i> (p)	
17- $\beta$ -estradiol	1 nM	-	0,1448	-
	10 nM	-	0,1713	-
	50 nM	↓ viabilidade celular	0,0343	S
	100 nM	↓ viabilidade celular	0,0215	S
Extracto de soja	45 $\mu$ g/mL	-	0,1701	-
	90 $\mu$ g/mL	-	0,1481	-
	180 $\mu$ g/mL	-	0,1250	-
	360 $\mu$ g/mL	↓ viabilidade celular	0,0169	S
Genisteína	25 $\mu$ M	↓ viabilidade celular	0,0176	-
	50 $\mu$ M	↓ viabilidade celular	0,0152	S
	100 $\mu$ M	↓ viabilidade celular	0,0018	S
Daidzeína	25 $\mu$ M	-	0,1191	-
	50 $\mu$ M	-	0,1673	-
	100 $\mu$ M	↓ viabilidade celular	0,0108	S

Podemos verificar que para todas as concentrações mais elevadas, ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular. Pelo contrário, para as concentrações mais baixas testadas, não se registaram diferenças estatisticamente significativas, à excepção da genisteína, em que ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade celular.

Os resultados obtidos para a daidzeína, parecem estar de acordo com os trabalhos publicados por outros investigadores (Hsu et al., 2010; Jin et al., 2010), que verificaram uma inibição da proliferação celular de células MCF7 em concentrações de daidzeína acima de 25  $\mu$ M.

Relativamente aos efeitos da genisteína, a diminuição da viabilidade celular que observámos, está de acordo com outros estudos realizados (Chen et al., 2003). Klein e colaboradores, que obtiveram resultados idênticos concluem que a diminuição da proliferação celular *in vitro* para a genisteína encontrava-se associada à inibição da proteína tirosina cinase; à inibição do crescimento celular devido à não fosforilação das proteínas requeridas para a divisão celular; à inibição da reparação do ADN, envolvendo a topoisomerase e à inibição da autofosforilação do factor de crescimento epidermal, que esta presente na maioria das células cancerígenas (Klein & King, 2007) .

A resposta do 17- $\beta$ -estradiol também está de acordo com outros estudos realizados para as concentrações mais reduzidas (Chow et al., 2004). Relativamente ao extracto de soja, são praticamente inexistentes os trabalhos publicados que estabeleçam uma relação entre os seus efeitos na viabilidade celular, em células MCF7.

No seguimento do protocolo 3, à semelhança dos ensaios realizados para a linha celular NHDF, procederam-se a ensaios de recuperação celular (3ª fase). Estes ensaios permitiram verificar se após a exposição a um determinado composto as células conseguiriam recuperar. A avaliação da recuperação é efectuada por ensaios de viabilidade celular (MTT). Na figura 20 podemos observar a percentagem de recuperação celular entre a 2ª e a 3ª fase do protocolo aplicado.

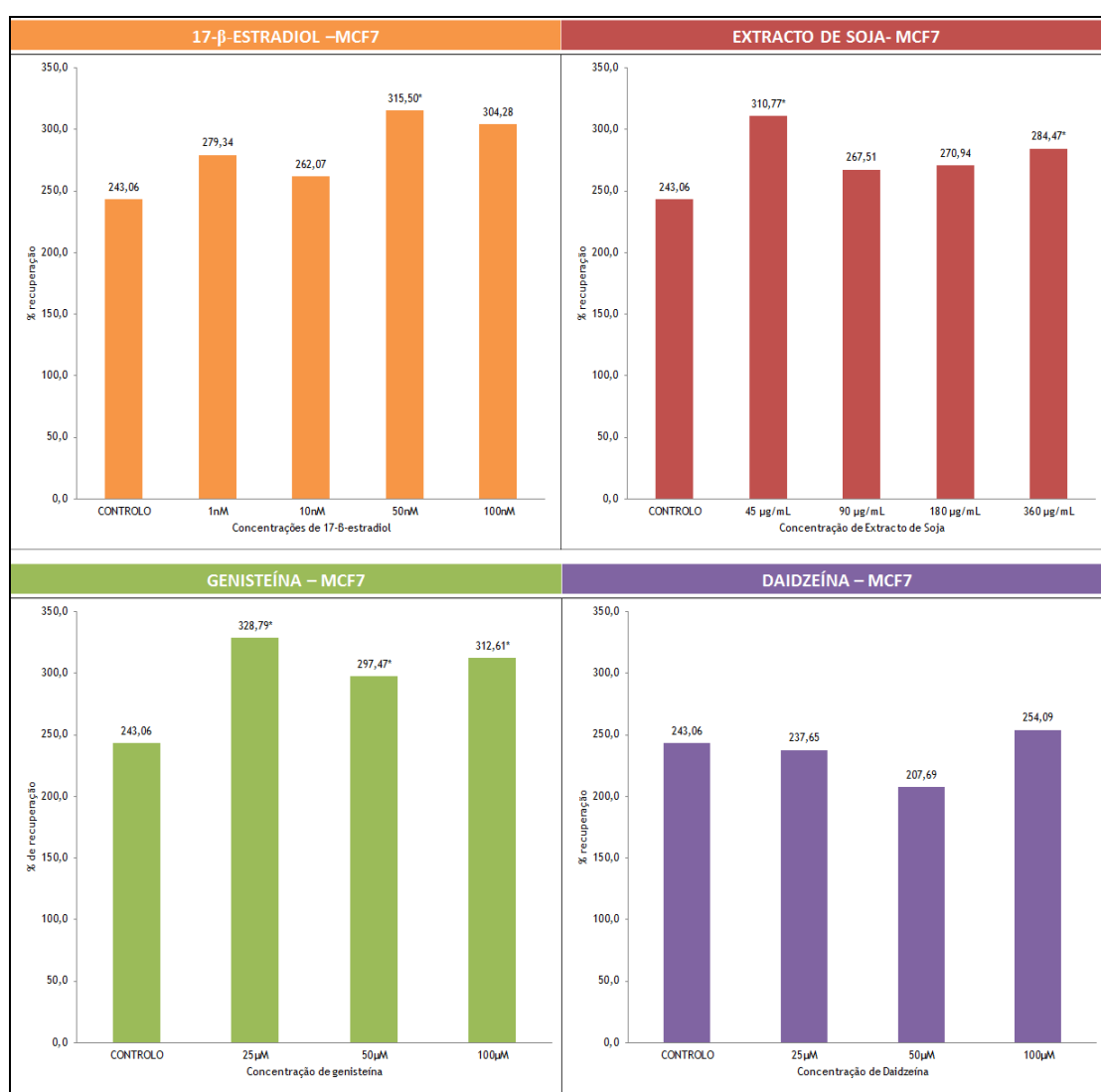


Figura 20- Representação gráfica da percentagem de recuperação celular para as MCF7. As colunas assinaladas com \* apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo. Aplicação da teoria matemática explicitada no “Material e Metodologia” (Ponto 9- Análise Estatística).

Na linha celular MCF7 verificou-se uma recuperação celular em todos os compostos testados. Qualquer acção citotóxica verificada nas primeiras 48 horas de contacto com os compostos foi reversível. A percentagem de recuperação foi bastante acentuada, envolvendo valores compreendidos entre 200 e 300%.

Para o 17- $\beta$ -estradiol, houve diferenças significativas na recuperação celular, para valores acima de 50nM. No caso do extracto de soja, ocorreram aumentos significativos na recuperação para a concentração mais elevada e para a mais reduzida. Os resultados para a genisteína mostram diferenças estatisticamente significativas para todas as concentrações testadas. Para a daidzeína, não ocorreram diferenças na percentagem da recuperação celular relativamente ao controlo.

Na linha celular MCF7, parece haver um paralelismo entre os resultados obtidos para o 17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja e para a genisteína. Para a daidzeína, apesar de haver uma recuperação positiva, esta é menor que qualquer um dos outros 3 compostos.

Como no extracto testado não estava descrito o conteúdo total em genisteína, foram comparados os resultados entre as concentrações equivalentes de daidzeína e extracto de soja nas MCF7.

### Comparação entre Extracto de Soja e daidzeína em MCF7

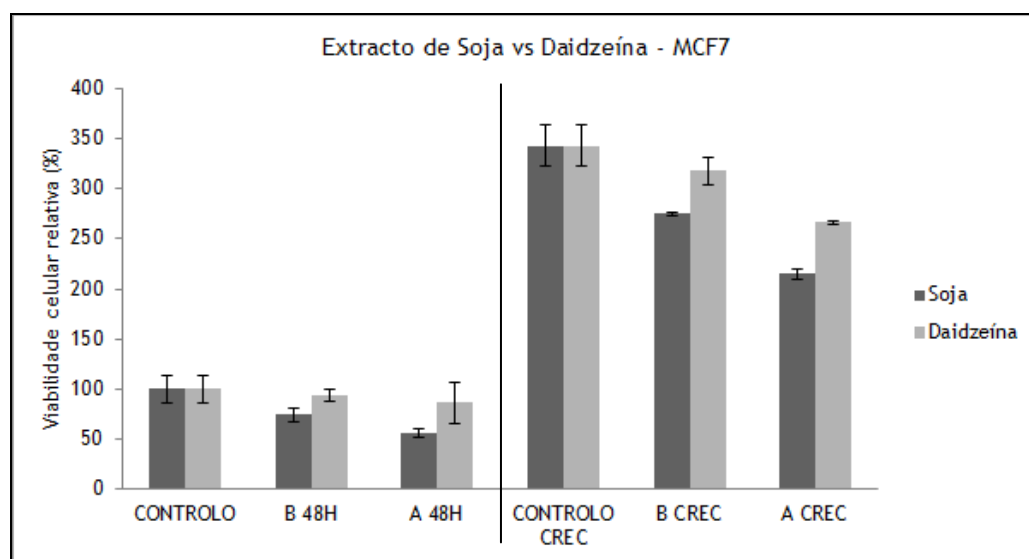


Gráfico 2- Comparação da influência na viabilidade celular de concentrações análogas de extracto de soja e de daidzeína. As concentrações equivalentes estão referenciadas na tabela 8. 48H- incubação durante 48 horas; CREC- Recuperação celular com meio de cultura; B- Concentração mais diluída; A- Concentração mais concentrada.

Para verificar se ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre as respostas obtidas pela daidzeína e pelo extracto de soja, foi aplicado o teste *t-student*. Os resultados obtidos para os valores de *p* calculados estão na tabela seguinte.

Tabela 11- Comparação das respostas obtidas pela daidzeína e pelo extracto de soja para as MCF7 através da análise estatística, usando o teste *t-student* ( $p < 0,05$ ).

	Comparação daidzeína vs extracto de soja após 48h de incubação (48H)		Comparação daidzeína vs extracto de soja, após recuperação (CREC)	
	<i>t-student</i> ( <i>p</i> )	Sig. estatístico	<i>t-student</i> ( <i>p</i> )	Sig. Estatístico
Controlo	1,000	-	1,000	-
B	0,185	-	0,062	-
A	0,067	-	0,078	-

Não houve diferenças estatisticamente significativas para as 2 concentrações testadas, quer após incubação com os compostos daidzeína e extracto de soja, quer após recuperação. No entanto, os valores de *p* calculados para as MCF7 foram inferiores aos da linha celular NHDF, sendo valores muito próximos de 0,05.

### 1.3. Comparação dos efeitos do 17- $\beta$ -estradiol, do extracto de soja e dos fitoestrogénios da soja (genisteína e daidzeína) em NHDF e MCF7

Foram comparadas as viabilidades celulares obtidas nas NHDF e nas MCF7, de forma a verificar se respondiam de forma diferente aos compostos em estudo.

As respostas obtidas para a incubação e após recuperação, foram representadas no mesmo gráfico, para ambos os tipos de células (Figura 21).

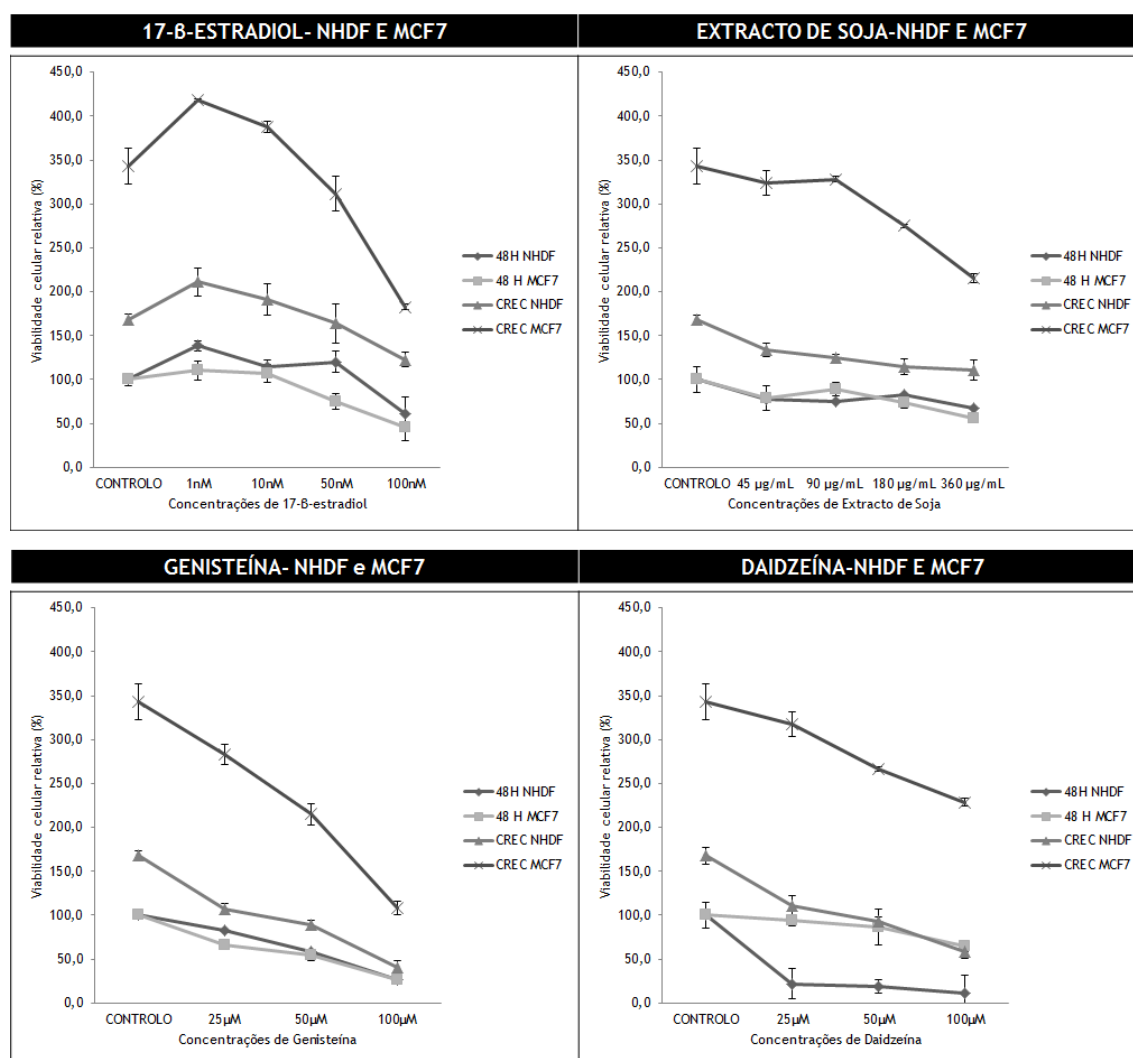


Figura 21- Gráficos representativos das viabilidades celulares relativas para 48h de incubação com os compostos de interesse (48H) e após recuperação (CREC) para as 2 linhas celulares testadas (NHDF e MCF7).

As respostas na viabilidade celular, obtidas para as duas linhas celulares, foram representadas no mesmo gráfico, para que a comparação gráfica das mesmas fosse facilitada.

Posteriormente foram estabelecidas comparações, através do teste estatístico *t-student*:

- Entre os efeitos na viabilidade celular após 48h de incubação com os compostos, em NHDF vs MCF7;
- Entre os efeitos na viabilidade celular após recuperação, em NHDF vs MCF7.

Para auxiliar a análise dos resultados obtidos, podemos observar um resumo dos mesmos na tabela 12.

Tabela 12- Análise estatística comparativa entre as respostas obtidas em NHDF e em MCF7 após incubação com os compostos de interesse e após recuperação com meio de cultura. Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

	48h de incubação dos compostos NHDF e MCF7		Recuperação NHDF e MCF7	
	<i>t-student</i> (p)	Sig. estatístico	<i>t-student</i> (p)	Sig. Estatístico
<i>17-<math>\beta</math> Estradiol</i>				
Controlo	1,000	-	0,048	S
1 nM	0,071	-	0,007	S
10 nM	0,198	.	0,004	S
50 nM	0,068	-	0,070	-
100 nM	0,120	-	0,055	-
<i>Extracto de soja</i>				
Controlo	1,000	-	0,008	S
45 $\mu$ g/mL	0,860	-	0,012	S
90 $\mu$ g/mL	0,435	-	0,001	S
180 $\mu$ g/mL	0,358	-	0,001	S
360 $\mu$ g/mL	0,985	-	0,026	S
<i>Genisteína</i>				
Controlo	1,000	-	0,035	S
25 $\mu$ M	0,121	-	0,023	S
50 $\mu$ M	0,669	-	0,030	S
100 $\mu$ M	0,884	.	0,077	-
<i>Daidzeína</i>				
Controlo	1,000	-	0,000	S
25 $\mu$ M	0,019	S	0,038	S
50 $\mu$ M	0,042	S	0,002	S
100 $\mu$ M	0,151	-	0,012	S

Após analisar os resultados obtidos, podemos verificar que após 48 horas de incubação com os compostos em estudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas celulares, à excepção do composto daidzeína, no qual a inibição da proliferação celular foi mais notável para a linha celular NHDF do que para as MCF7.

Após recuperação registaram-se diferenças estatisticamente significativas para todas as concentrações testadas, exceptuando as concentrações mais elevadas de 17- $\beta$ -estradiol e a concentração de 100 $\mu$ M de genisteína.

Foram comparadas as razões de proliferação celular após recuperação para as 2 linhas celulares testadas (Figura 22).

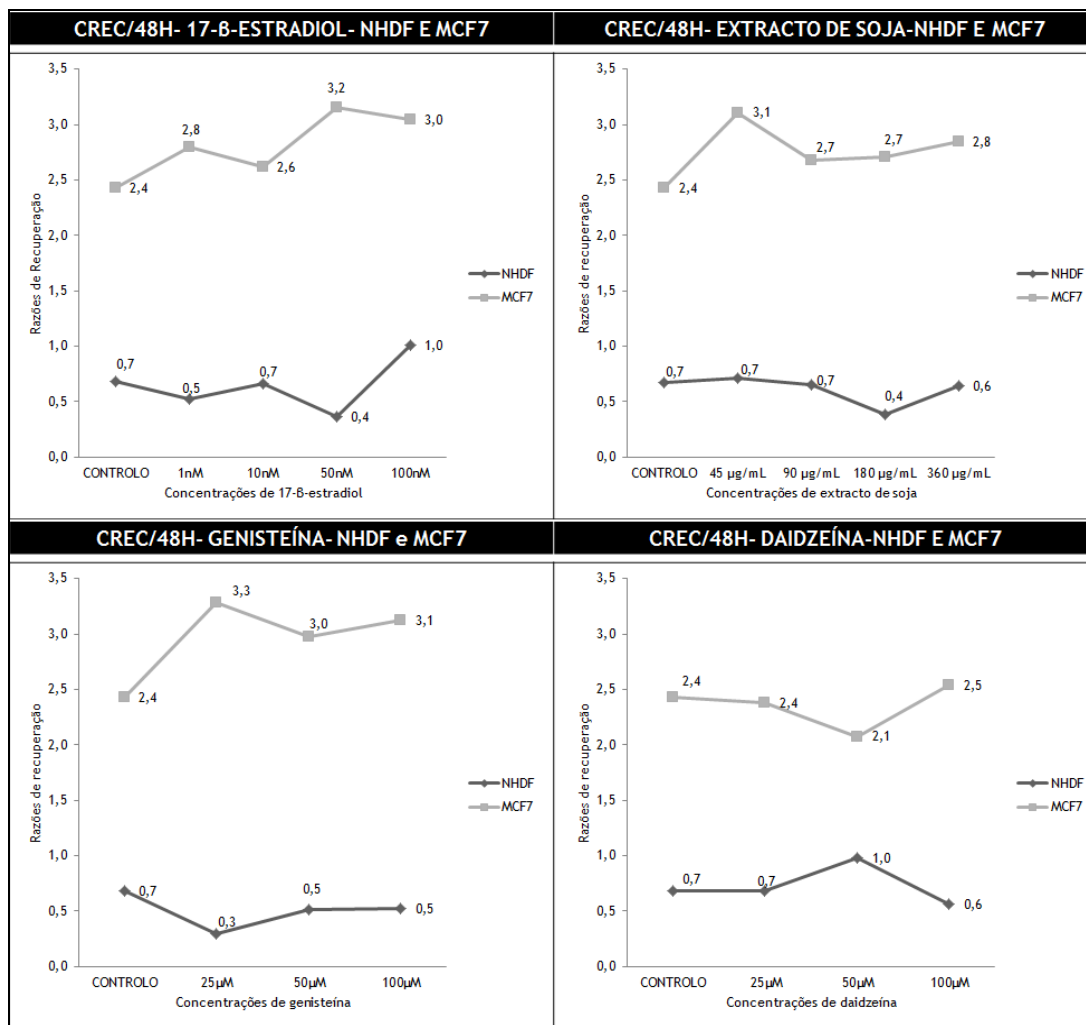


Figura 22 - Razões de recuperação para as 2 linhas celulares (NHDF e MCF7), após 48 horas de incubação com os compostos em estudo e após recuperação.

Como podemos verificar nos gráficos acima referidos, há maiores razões de crescimento para as MCF7, comparativamente às NHDF. Como as MCF7 pertencem a uma linha celular cancerígena, dividem-se muito mais rapidamente que uma linha de células saudáveis. Por outro lado, podem apresentar uma expressão elevada de ER, o que implica naturalmente uma resposta aos compostos estrogénicos, também aumentada. Todos os compostos estudados potenciaram as respostas na recuperação celular, o que nos permite concluir que nenhum deles apresenta um efeito protector, que seria, neste caso, uma diminuição da viabilidade celular após recuperação.

## 2. Estudos preliminares da marcação da apoptose (Citometria de Fluxo)

Foram realizados estudos de marcação de apoptose para as NHDF e para as MCF7, com o objectivo de aprofundar o nosso conhecimento relativamente aos efeitos reais dos compostos estudados.

Nos pontos 2.1 e 2.2 podemos ver representados os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo efectuados. Os gráficos da direita definem a população em estudo e os gráficos da esquerda definem os resultados obtidos após marcação com a Anexina V-FITC e com o Iodeto de Propídeo.

### 2.1. Fibroblastos da derme humana- NHDF

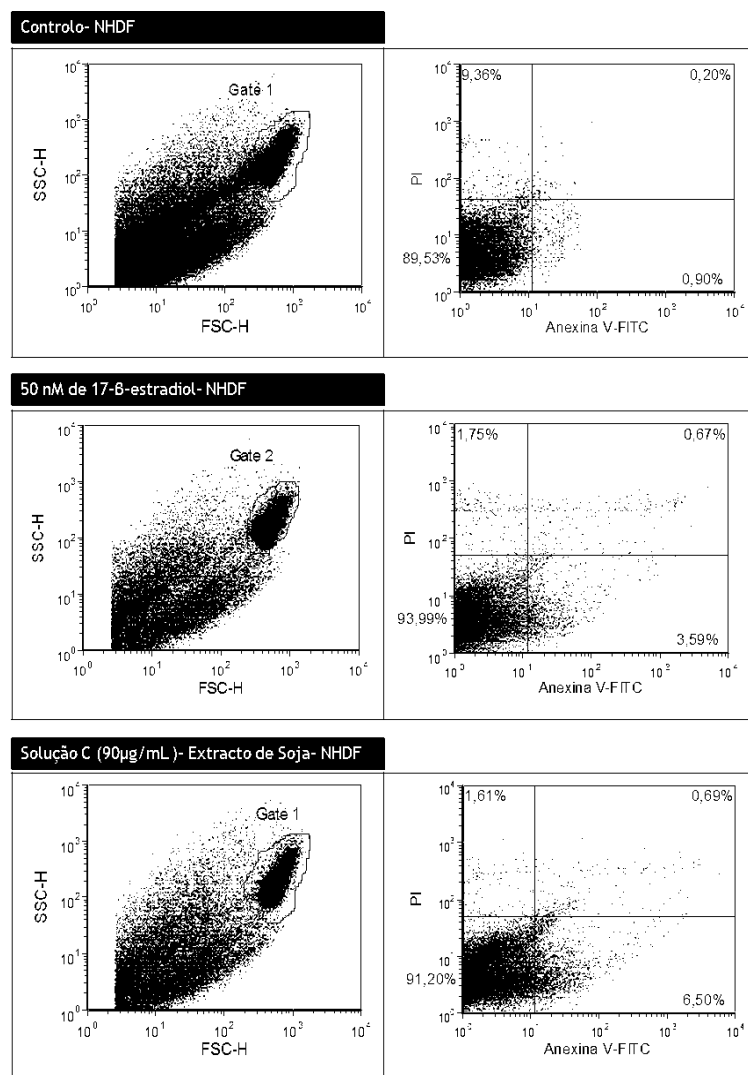


Figura 23- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células NHDF (controlo, extracto de soja e 17-B-estradiol)

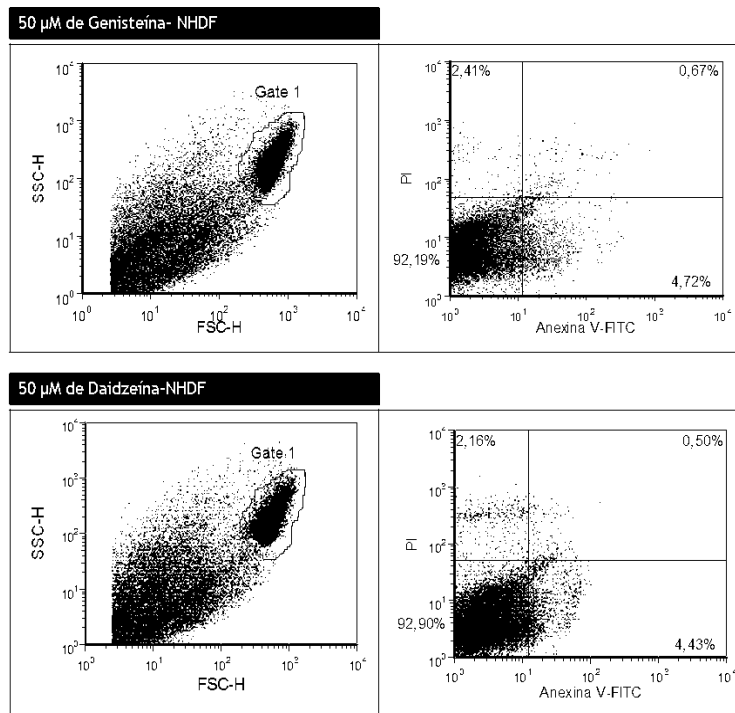


Figura 24- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células NHDF (genisteína e daidzeína).

## 2.2. Células epiteliais MCF7

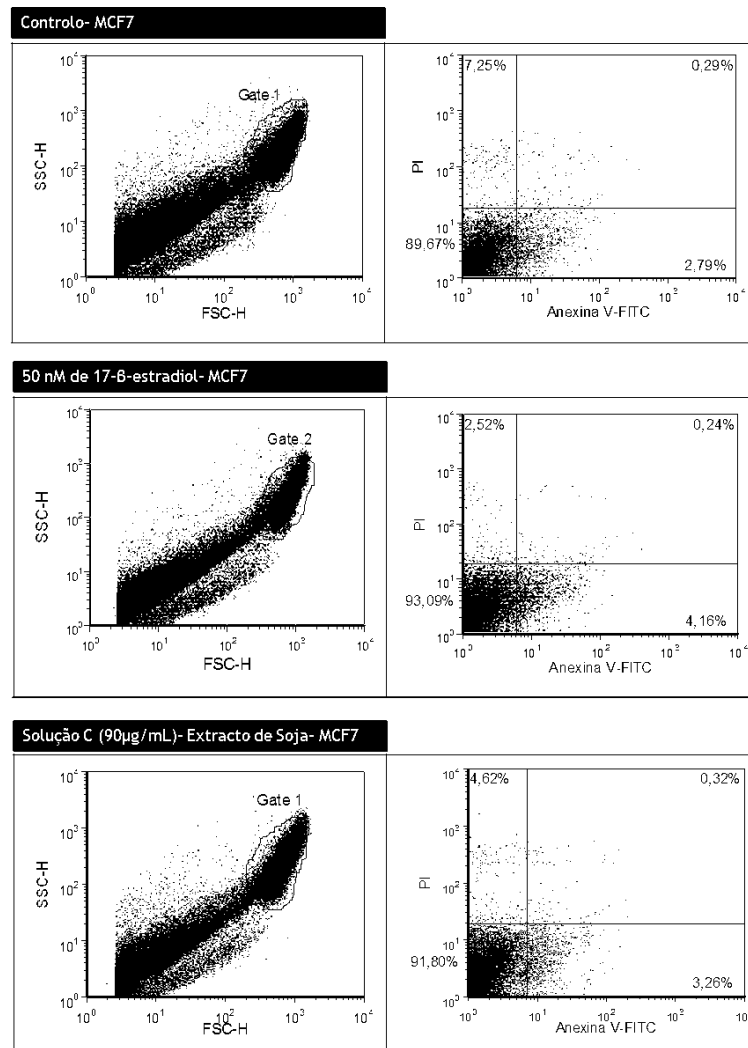


Figura 25- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células MCF7 (controlo, extracto de soja e 17-B-estradiol).

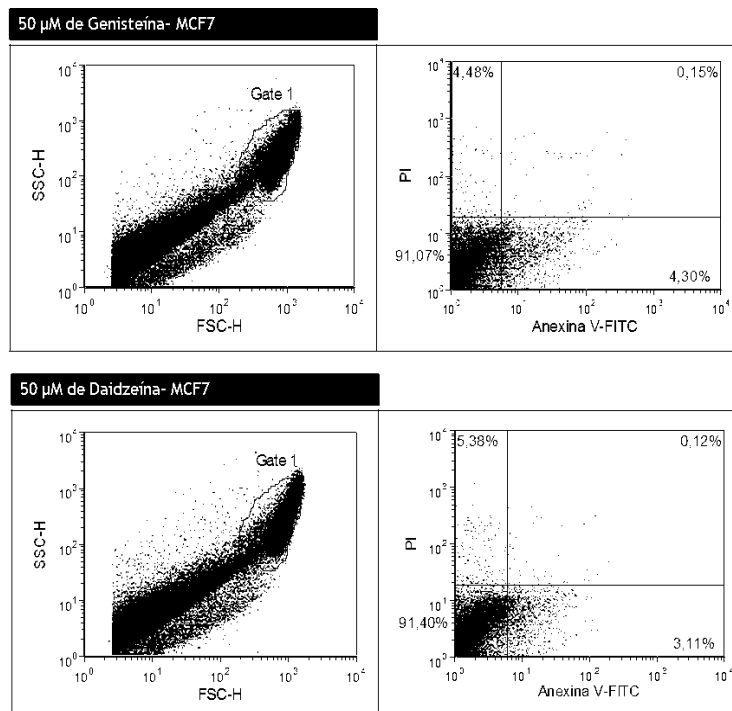


Figura 26- Gráficos obtidos através da aplicação de citometria de fluxo a culturas de células NHDF (genisteína e daidzeína).

### 2.3. Comparação dos resultados obtidos relativos à indução de apoptose e morte celular para MCF7 e NHDF

Para verificar as diferenças entre os dois tipos de células testados, foram comparadas as percentagens de apoptose inicial (quadrante inferior direito) e de morte celular por necrose (quadrante superior esquerdo) (figura 27).

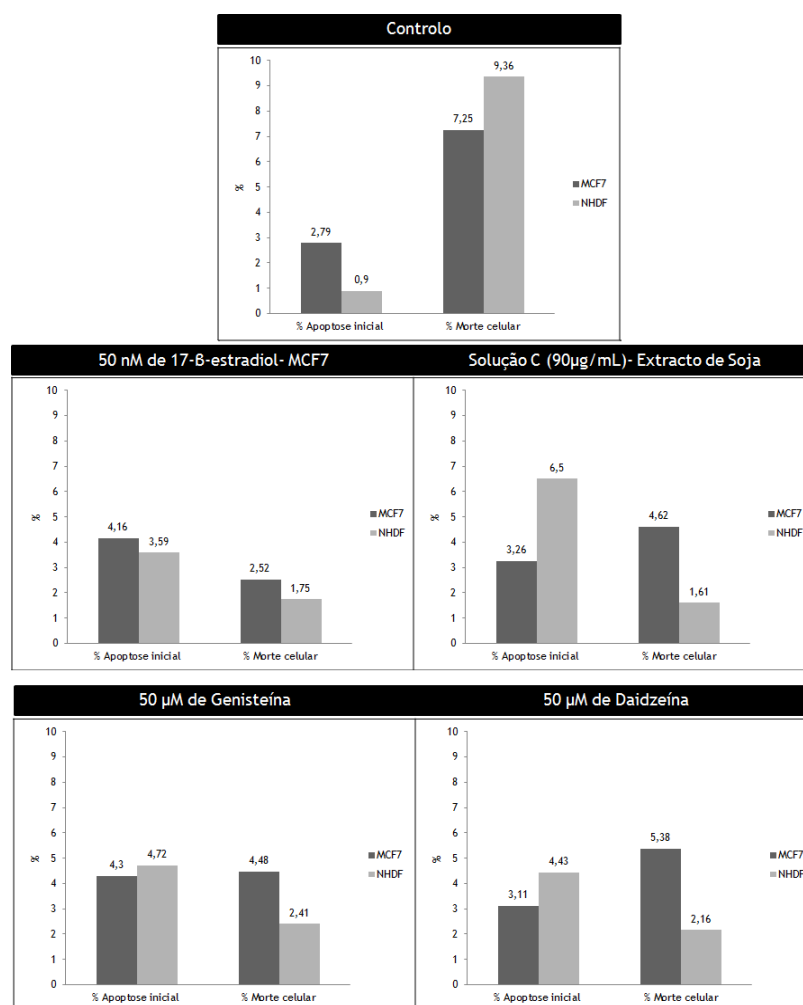


Figura 27- Gráficos comparativos das percentagens de morte celular (necrose) e apoptose inicial em NHDF e MCF7, aplicando concentrações intermédias dos compostos.

Na linha celular NHDF, podemos verificar que para o controlo, isto é, na ausência de compostos de interesse, há uma morte celular mais elevada (9,36%) comparativamente à apoptose inicial (0,90%). Após a incubação com as concentrações intermédias dos compostos em estudo, podemos verificar que a tendência se inverte, ou seja, ocorre uma maior apoptose inicial, após incubação com os compostos, e uma menor percentagem de morte celular. O composto que apresenta uma maior apoptose inicial é o extracto de soja, seguido da genisteína, daidzeína e por fim o 17- $\beta$ -estradiol.

---

Na linha celular MCF7 podemos verificar que, para o controlo, há uma morte celular mais elevada (7,25%), comparativamente à apoptose inicial (2,79%). Após a incubação com as concentrações intermédias dos compostos, podemos verificar que para o 17- $\beta$ -estradiol essa tendência se inverte (maior percentagem de apoptose inicial comparativamente a morte celular). No entanto, para o extracto de soja, genisteína e daidzeína, ocorre uma maior percentagem de morte celular, comparativamente à apoptose inicial. No caso da apoptose inicial, os valores de todos os compostos são semelhantes (variação entre 3,11 % para a daidzeína e 4,3% para a genisteína). Quanto à percentagem de morte celular é sempre mais elevada para as MCF7 que para as NHDF.

Resumindo, para as MCF7, praticamente todos os compostos testados (à excepção do 17- $\beta$ -estradiol), induzem a morte celular por necrose e a daidzeína é o composto que apresenta uma maior percentagem registada. Todos os compostos estudados induzem a apoptose inicial, que parecem indicar uma relativa acção protectora dos compostos testados, com especial evidência para a genisteína, que apresenta a maior percentagem de apoptose inicial registada para as MCF7. No entanto, nenhum destes valores é muito elevado, podendo ser considerados irrelevantes.

Em relação às NHDF, todos os compostos, sem excepção, induzem a apoptose inicial numa maior percentagem que a morte celular por necrose. Podemos considerar que estes compostos, tal como as células MCF7, os resultados parecem indicar uma relativa acção protectora dos compostos estudados, no entanto, nenhum destes valores é muito elevado e também pode ser considerado irrelevante.

Uma vez que estes resultados não estão de acordo com estudos realizados por outros autores, (Jin et al., 2010) e como apenas foi realizado 1 ensaio, para uma única concentração de cada composto em estudo, não poderemos tirar conclusões.

### 3. Análise comparativa entre os estudos de viabilidade celular (MTT) e os estudos de marcação de apoptose (Citometria de Fluxo)

Os gráficos obtidos para a viabilidade celular relativa, após incubação e após recuperação, bem como os gráficos obtidos pela análise da citometria de fluxo, estão representados nos pontos 3.1 e 3.2.

Para cada composto foi testada apenas uma concentração (concentração intermédia).

#### 3.1. Fibroblastos saudáveis NHDF

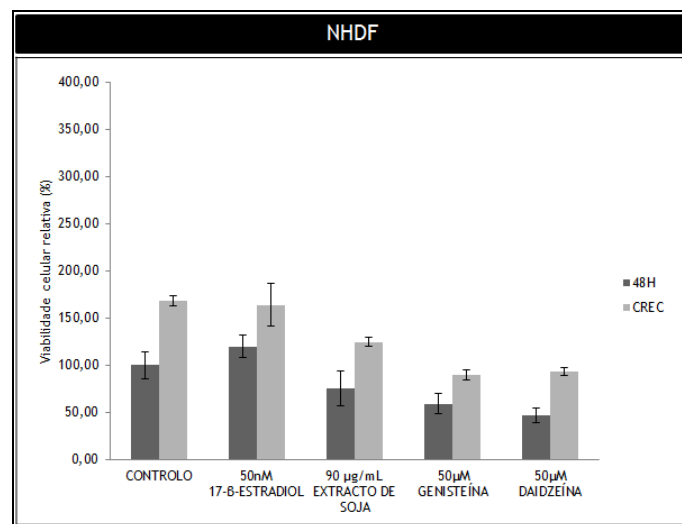


Gráfico 3- Valores de viabilidade celulares relativas após incubação (48H) e recuperação (CREC), para a linha celular NHDF.

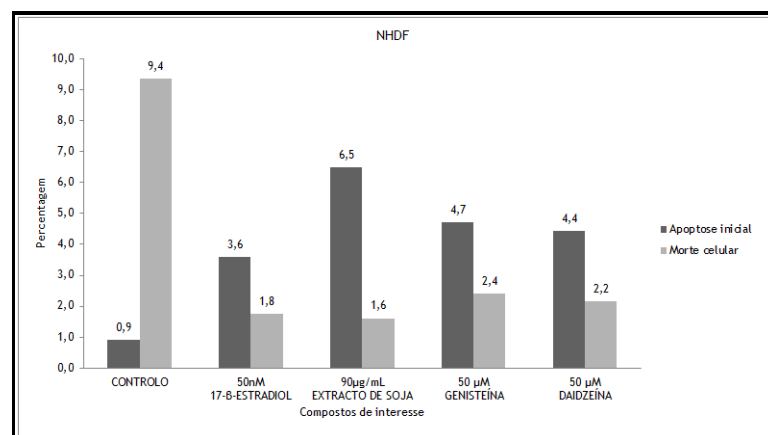


Gráfico 4- Percentagens de apoptose inicial e de morte celular (necrose) obtidas após incubação com os compostos, para a linha celular NHDF.

### 3.2. Células epiteliais cancerígenas MCF7

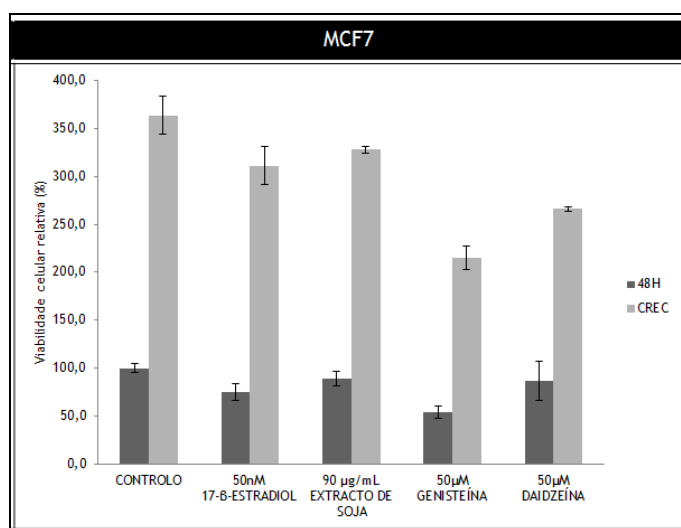


Gráfico 5- Valores de viabilidade celulares relativas após incubação (48H) e recuperação (CREC), para a linha celular MCF7.

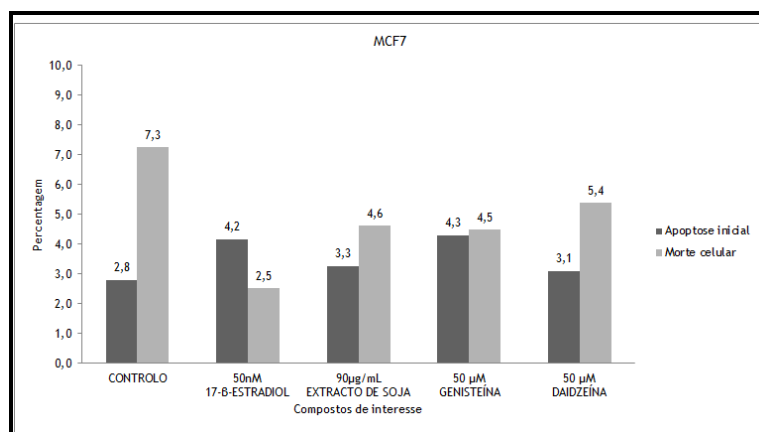


Gráfico 6 - Percentagens de apoptose inicial e de morte celular (necrose) obtidas após incubação com os compostos para as MCF7

Através da visualização dos gráficos podemos retirar algumas ilações. A linha celular NHDF apresenta maiores percentagens de apoptose inicial quando comparadas com a linha celular MCF7. Como há uma maior susceptibilidade da apoptose ser induzida nas NHDF, esta poderá ser uma justificação para a menor proliferação após recuperação, verificada nas NHDF. Pelo contrário, as menores percentagens de apoptose inicial obtidas para as MCF7 poderão ser justificativas para as taxas de recuperação celular elevadas. Ao não ocorrer apoptose, considerada como um processo anti-tumoral efectivo e benéfico, as células continuam a proliferar indefinidamente, sendo uma possível justificação para as razões de proliferação tão elevadas para as MCF7. Klein e colaboradores defendem também esta hipótese, num trabalho publicado em 2007 (Klein & King, 2007).

Contudo, voltamos a realçar que não temos um número de ensaios suficientes, relativamente aos estudos de marcação da apoptose, para podermos tirar conclusões.

## 4. Comparação entre a resposta das células NHDF e MCF7 aos compostos comerciais aplicados em terapia hormonal de substituição: Estudo preliminar

Foram testadas as mesmas diluições de 1 cápsula de extracto de soja e de 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (representado como THS nos gráficos). Estes compostos, ambos recomendados na terapia hormonal de substituição, foram incubados nas NHDF e nas MCF7. Numa fase inicial foram comparadas as respostas obtidas pelo comprimido e pela cápsula, na mesma linha celular, para ver se ocorriam diferenças estatisticamente significativas entre os dois compostos, através do teste estatístico *t-student*.

### 4.1. Comparação entre Extracto de Soja e THS em NHDF

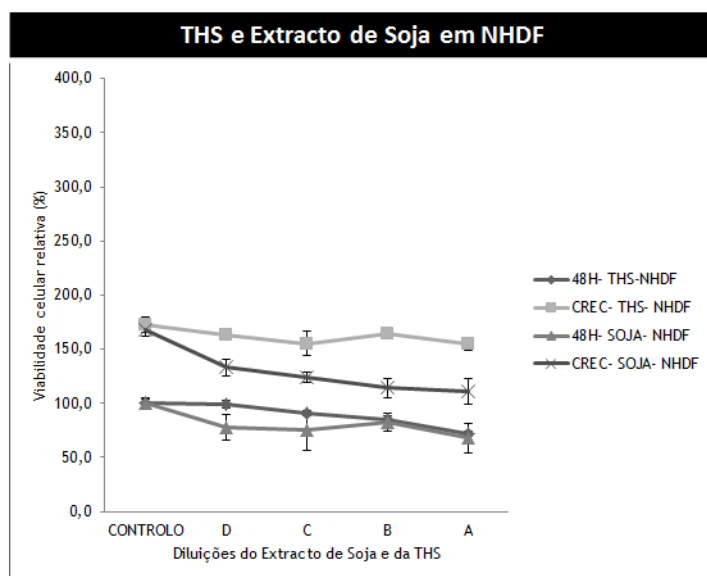


Gráfico 7- Representação da viabilidade celular obtida após 48 horas de incubação, com as mesmas diluições de 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de Soja, e após recuperação, para NHDF.

Tabela 13- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos para diversas diluições de 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de soja após 48 horas de incubação nas células NHDF (THS vs Soja 48h). Comparação dos resultados obtidos após recuperação (THS vs Soja CREC). Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Diluição	THS vs Soja (48H)		THS vs Soja (CREC)	
	<i>t-student</i> ( <i>p</i> )		<i>t-student</i> ( <i>p</i> )	
CONTROLO	1,000	-	0,6946	-
D	0,042	S	0,0824	-
C	0,322	-	0,1515	-
B	0,738	-	0,0611	-
A	0,206	-	0,0287	S

Para a linha celular NHDF podemos afirmar que praticamente não existem diferenças estatisticamente significativas entre a resposta na viabilidade celular de 1 cápsula de extracto de soja e de 1 comprimido de 17-B-estradiol (THS), quer após incubação com as diferentes diluições, quer após recuperação com meio de cultura. Apenas para a diluição D, no caso das 48 horas de incubação e para a diluição A, após recuperação, existem diferenças estatisticamente significativas.

#### 4.2. Comparação entre Extracto de Soja e THS em MCF7

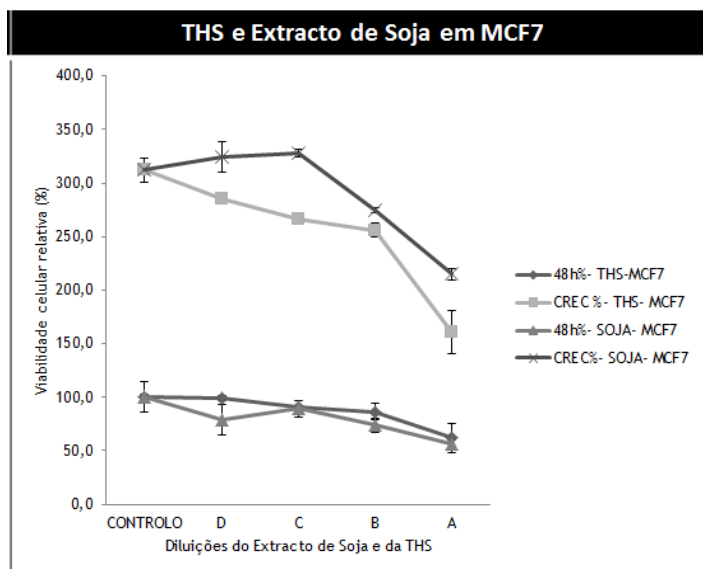


Gráfico 8- Representação da viabilidade celular obtida após 48 horas de incubação, com as mesmas diluições de 1 comprimido de 17-B-estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de Soja, e após recuperação, para MCF7.

Tabela 14- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos para diversas diluições de 1 comprimido de 17-B-estradiol (THS) e de 1 cápsula de Extracto de soja após 48 horas de incubação nas células NHDF (THS vs Soja 48h). Comparação dos resultados obtidos após recuperação (THS vs Soja CREC). Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Diluição	THS vs Soja (48h)		THS vs Soja (CREC)	
	<i>t-student</i> (p)		<i>t-student</i> (p)	
CONTROLO	1,000	-	1,000	-
D	0,154	-	0,043	S
C	0,748	-	0,019	S
B	0,259	-	0,361	-
A	0,378	-	0,051	S

Para as MCF7 não se verificam diferenças estatisticamente significativas após 48 horas de incubação. No entanto, ocorrem diferenças estatisticamente significativas após recuperação, entre o extracto de soja e o 17-B-estradiol comercial (THS), tendo o extracto de soja apresentado uma recuperação mais acentuada, estatisticamente comprovada.

### 4.3. Comparação entre o 17- $\beta$ -estradiol comercial (THS) e o Extracto de soja em MCF7 e em NHDF

Após comparação dos 2 compostos testados, para cada linha celular individualmente, foi comparada a resposta obtida nos 2 tipos de células (NHDF e MCF7). No gráfico 9 encontram-se representados os resultados da viabilidade celular após incubação e recuperação nas 2 linhas celulares. Para verificar se haviam diferenças estatisticamente significativas entre as 2 linhas celulares, foi aplicado o teste estatístico *t-student* para comparar as respostas após incubação (tabela 15) e após recuperação (tabela 16).

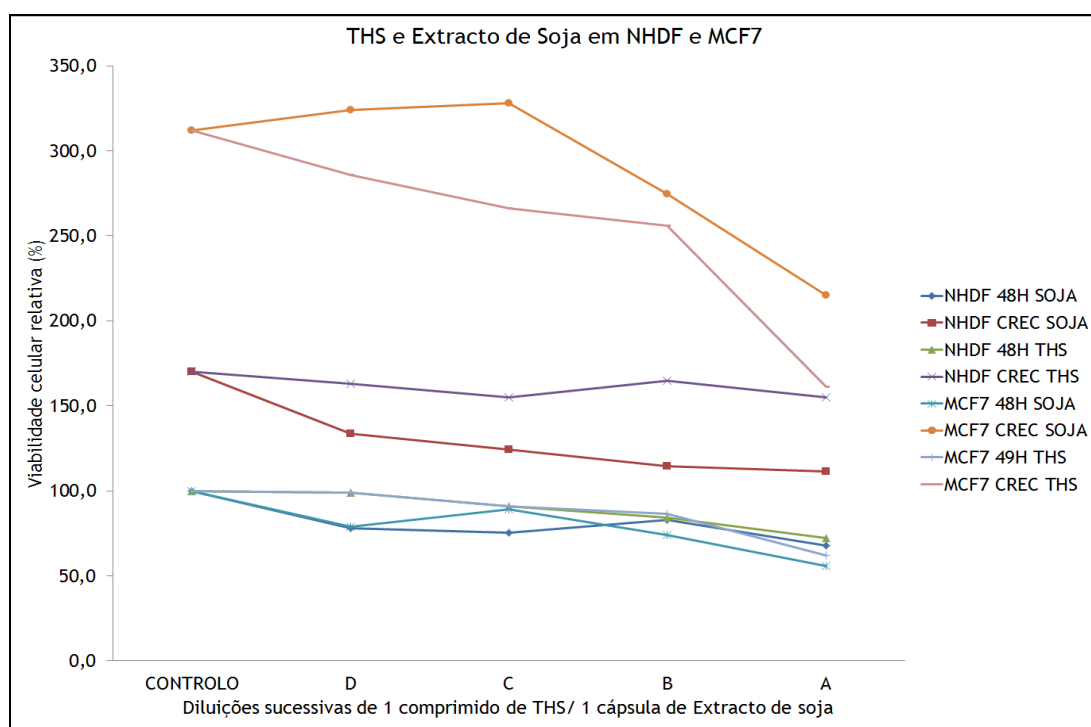


Gráfico 9- Comparação da viabilidade celular após incubação (48H) e após recuperação (CREC) para as mesmas diluições de 1 cápsula de extracto de soja e para 1 comprimido de 17- $\beta$ -estradiol (THS), nas linhas celulares MCF7 e NHDF.

Tabela 15- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos após 48 horas de incubação com os 2 compostos, nas células MCF7 e NHDF. Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Incubação durante 48h	THS MCF7 vs NHDF		EXTRACTO DE SOJA em MCF7 vs NHDF	
	<i>t-student</i> (p)		<i>t-student</i> (p)	
Diluição				
CONTROLO	1,000	-	1,000	-
D	0,893	-	0,860	-
C	0,932	-	0,435	-
B	0,503	-	0,358	-
A	0,335	-	0,985	-

Tabela 16- Resultados da comparação entre os valores de viabilidade celular obtidos após recuperação, nas células MCF7 e NHDF. Consideram-se diferenças estatisticamente significativas (S), quando aplicando o teste *t-student* obtemos um valor de  $p < 0,05$ .

Recuperação	THS MCF7 vs NHDF		EXTRACTO DE SOJA em MCF7 vs NHDF	
Diluição	<i>t-student</i> ( <i>p</i> )		<i>t-student</i> ( <i>p</i> )	
CONTROLO	0,030	S	0,008	S
D	0,007	S	0,012	S
C	0,006	S	0,001	S
B	0,005	S	0,001	S
A	0,872	-	0,026	S

Em termos qualitativos, após 48h em contacto com os compostos não há diferenças significativas entre as 2 linhas celulares estudadas. No entanto, quando comparamos os valores de viabilidade celular após recuperação, verificamos que a linha celular MCF7 apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação à linha NHDF, demonstrando recuperações mais acentuadas.

Os valores obtidos para a recuperação do extracto de soja, na linha celular MCF7, apresentam uma proliferação celular muito mais acentuada do que os valores apresentados para o 17- $\beta$ -estradiol comercial (THS); diferenças estatisticamente comprovadas na tabela 14. Podemos concluir que o seguinte alerta deve ser efectuado: A recomendação do extracto de soja deve ser acautelada, pois pode acentuar a proliferação celular em tecidos cancerígenos.

---

# Conclusões

Concluimos que o protocolo, que defendia como constante a presença de FBS com tempos de incubação e recuperação de 48 horas, foi considerado o cientificamente mais correcto, já que possibilitou uma proliferação apenas dependente dos mecanismos celulares.

Os compostos estrogénicos (17- $\beta$ -estradiol, extracto de soja, daidzeína e genisteína) diminuem a viabilidade celular em NHDF e MCF7, em concentrações elevadas.

Os estudos de recuperação mostraram que, após o efeito directo dos compostos de interesse, se mantinha um aumento da viabilidade celular para ambos os tipos de células, sendo mais proeminente no caso das células epiteliais MCF7.

O efeito do extracto de soja parece dever-se ao componente daidzeína.

Os resultados preliminares da comparação dos efeitos das formas comerciais (extracto de soja e 17- $\beta$ -estradiol, aconselhados na terapia hormonal de substituição), parecem indicar que não existem diferenças significativas nas primeiras 48 horas. Contudo, quando comparamos os valores de viabilidade celular, após recuperação, a linha celular MCF7 apresenta uma proliferação aumentada.

Depreendemos, também, que a recomendação do extracto de soja deve ser acautelada, pois pode acentuar a proliferação celular em tecidos cancerígenos.

---

---

## Perspectivas Futuras

- Testar outros extractos de soja, que tenham bem quantificados os componentes activos, como por exemplo as isoflavonas, de forma a podermos comparar as mesmas e com o extracto;
- Testar um maior espectro de concentrações nos ensaios de viabilidade celular;
- Testar os mesmos compostos em linhas celulares diferentes, por exemplo outras células cancerígenas;
- Terminar os estudos relativos à capacidade de indução de apoptose;
- Estudar outros marcadores na indução da apoptose através de ensaios de citometria de fluxo, nomeadamente a expressão de p53 e de Bcl-2.

---

---

# Bibliografia

- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Goepfing, T.S., Doerge, D.R., Helferich, W.G. 2004. Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis*, **25**(9), 1649-57.
- Allred, C.D., Ju, Y.H., Allred, K.F., Chang, J., Helferich, W.G. 2001. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*, **22**(10), 1667-73.
- APD. 2011. Soja em discussão, Vol. 2011, Associação Portuguesa de Dietistas.
- Baber, R. 2010. Phytoestrogens and post reproductive health. *Maturitas*, **66**(4), 344-9.
- Bai, Z., Gust, R. 2009. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Arch Pharm (Weinheim)*, **342**(3), 133-49.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., Sarkar, F.H. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett*, **269**(2), 226-42.
- Bao, L., Zou, S.E., Zhang, S.F. 2011. [Dose-dependent effects of daidzein in regulating bone formation through estrogen receptors and peroxisome proliferator-activated receptor gamma]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, **9**(2), 165-72.
- Barnes, J. 2003a. Pharmacovigilance of herbal medicines : a UK perspective. *Drug Saf*, **26**(12), 829-51.
- Barnes, J. 2003b. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II: Efficacy and safety. *Br J Clin Pharmacol*, **55**(4), 331-40.
- Benassayag, C., Perrot-Applanat, M., Ferre, F. 2002. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **777**(1-2), 233-48.
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncaglia, R., Boraldi, F., Tiozzo, R., Sharrard, M., Corti, A. 1999. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*, **446**(1), 18-22.
- Bjornstrom, L., Sjoberg, M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, **19**(4), 833-42.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schoffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. 2010. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*, **27**(1), 53-62.
- Cederroth, C.R., Nef, S. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol*, **304**(1-2), 30-42.

- 
- Celojevic, D., Petersen, A., Karlsson, J.O., Behndig, A., Zetterberg, M. 2011. Effects of 17beta-estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells. *Mol Vis*, **17**, 1987-96.
- Chandrasena, R.E., Edirisinghe, P.D., Bolton, J.L., Thatcher, G.R. 2008. Problematic detoxification of estrogen quinones by NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferase. *Chem Res Toxicol*, **21**(7), 1324-9.
- Chen, W.F., Huang, M.H., Tzang, C.H., Yang, M., Wong, M.S. 2003. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta*, **1638**(2), 187-96.
- Choi, E.J., Kim, G.H. 2008. Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. *Phytomedicine*, **15**(9), 683-90.
- Chow, S.K., Chan, J.Y., Fung, K.P. 2004. Suppression of cell proliferation and regulation of estrogen receptor alpha signaling pathway by arsenic trioxide on human breast cancer MCF-7 cells. *J Endocrinol*, **182**(2), 325-37.
- Co-Extra. 2008. EU Commission: Food and feed from another GM soybean approved, Vol. 2011.
- Di Virgilio, A.L., Iwami, K., Watjen, W., Kahl, R., Degen, G.H. 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol Lett*, **151**(1), 151-62.
- Dong, J.Y., Qin, L.Q. 2011. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*, **125**(2), 315-23.
- Ernst, E. 2005. The efficacy of herbal medicine--an overview. *Fundam Clin Pharmacol*, **19**(4), 405-9.
- Fitzpatrick, L.A. 2003. Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas*, **44 Suppl 1**, S21-9.
- Freshney, R.I. 2006. Basic Principles of Cell Cultures. 4-21.
- Garcia, M.C., Torre, M., Marina, M.L., Laborda, F. 1997. Composition and characterization of soyabean and related products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **37**(4), 361-91.
- Goodman-Gruen, D., Kritz-Silverstein, D. 2003. Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. *Menopause*, **10**(5), 427-32.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C. 2002. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, **346**(5), 340-52.
- Gstraunthaler, G. 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX*, **20**(4), 275-81.
- Guo, J.M., Xiao, B.X., Dai, D.J., Liu, Q., Ma, H.H. 2004. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol*, **10**(6), 860-3.

- 
- Haczynski, J., Tarkowski, R., Jarzabek, K., Slomczynska, M., Wolczynski, S., Magoffin, D.A., Jakowicki, J.A., Jakimiuk, A.J. 2002. Human cultured skin fibroblasts express estrogen receptor alpha and beta. *Int J Mol Med*, **10**(2), 149-53.
- Hall, G., Phillips, T.J. 2005. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*, **53**(4), 555-68; quiz 569-72.
- Hewitt, A.L., Singletary, K.W. 2003. Soy extract inhibits mammary adenocarcinoma growth in a syngeneic mouse model. *Cancer Lett*, **192**(2), 133-43.
- Hillman, G.G., Singh-Gupta, V. 2011. Soy isoflavones sensitize cancer cells to radiotherapy. *Free Radic Biol Med*, **51**(2), 289-98.
- Hsu, A., Bray, T.M., Helferich, W.G., Doerge, D.R., Ho, E. 2010. Differential effects of whole soy extract and soy isoflavones on apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, **235**(1), 90-7.
- InvitrogenLifeSciences. 2011. Guidelines for Maintaining Cultured Cells.
- Jian, L. 2009. Soy, isoflavones, and prostate cancer. *Mol Nutr Food Res*, **53**(2), 217-26.
- Jin, S., Zhang, Q.Y., Kang, X.M., Wang, J.X., Zhao, W.H. 2010. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol*, **21**(2), 263-8.
- Ju, Y.H., Fultz, J., Allred, K.F., Doerge, D.R., Helferich, W.G. 2006. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis*, **27**(4), 856-63.
- Khan, N., Adhami, V.M., Mukhtar, H. 2010. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, **17**(1), R39-52.
- Kim, H.A., Jeong, K.S., Kim, Y.K. 2008. Soy extract is more potent than genistein on tumor growth inhibition. *Anticancer Res*, **28**(5A), 2837-41.
- Klein, C.B., King, A.A. 2007. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol*, **224**(1), 1-11.
- Kumar, S., Lata, K., Mukhopadhyay, S., Mukherjee, T.K. 2010. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochim Biophys Acta*, **1800**(10), 1127-35.
- Kwack, S.J., Kim, K.B., Kim, H.S., Yoon, K.S., Lee, B.M. 2009. Risk assessment of soybean-based phytoestrogens. *J Toxicol Environ Health A*, **72**(21-22), 1254-61.
- Leclercq, G., de Cremoux, P., This, P., Jacquot, Y. 2011. Lack of sufficient information on the specificity and selectivity of commercial phytoestrogens preparations for therapeutic purposes. *Maturitas*, **68**(1), 56-64.

- 
- Levenson, A.S., Jordan, V.C. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*, **57**(15), 3071-8.
- Liu, Z.M., Chen, Y.M., Ho, S.C. 2011. Effects of soy intake on glycemic control: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, **93**(5), 1092-101.
- Mai, Z., Blackburn, G.L., Zhou, J.R. 2007. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. *Carcinogenesis*, **28**(6), 1217-23.
- Markowitz, J.S., von Moltke, L.L., Donovan, J.L. 2008. Predicting interactions between conventional medications and botanical products on the basis of in vitro investigations. *Mol Nutr Food Res*, **52**(7), 747-54.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M.J., Zapata-Revilla, M.A. 2008. Soybean, a promising health source. *Nutr Hosp*, **23**(4), 305-12.
- Millas I., L.B. 2009. Estrogen receptors alpha and beta in non-target organs for hormone action: review of the literature. *Braz. J. Morphol. Sci*, **26**(2-4), 193-197.
- Mitrunen, K., Hirvonen, A. 2003. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res*, **544**(1), 9-41.
- Mooney, L.M., Al-Sakkaf, K.A., Brown, B.L., Dobson, P.R. 2002. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer*, **87**(8), 909-17.
- Nilsen, J. 2008. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Front Neuroendocrinol*, **29**(4), 463-75.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, **81**(4), 1535-65.
- Nobert, G.S., Kraak, M.M., Crawford, S. 2006. Estrogen dependent growth inhibitory effects of tamoxifen but not genistein in solid tumors derived from estrogen receptor positive (ER+) primary breast carcinoma MCF7: single agent and novel combined treatment approaches. *Bull Cancer*, **93**(7), E59-66.
- Papoutsis, Z., Zhao, C., Putnik, M., Gustafsson, J.A., Dahlman-Wright, K. 2009. Binding of estrogen receptor alpha/beta heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *J Mol Endocrinol*, **43**(2), 65-72.
- Patisaul, H.B., Jefferson, W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol*, **31**(4), 400-19.
- Patlolla, A., Knighten, B., Tchounwou, P. 2010. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethn Dis*, **20**(1 Suppl 1), S1-65-72.

- 
- Pavese, J.M., Farmer, R.L., Bergan, R.C. 2010. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev*, **29**(3), 465-82.
- Petri Nahas, E., Nahas Neto, J., De Luca, L., Traiman, P., Pontes, A., Dalben, I. 2004. Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas*, **48**(4), 372-80.
- Prossnitz, E.R., Oprea, T.I., Sklar, L.A., Arterburn, J.B. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **109**(3-5), 350-3.
- Pugi, A., Gallo, E., Vannacci, A., Lapi, F., Firenzuoli, F. 2011. Herbal remedies in hospital setting: an Italian explorative survey among physicians and patients on knowledge and use. *Intern Emerg Med*.
- Ramos, S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, **18**(7), 427-42.
- Rucinska, A., Roszczyk, M., Gabryelak, T. 2008. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biol Int*, **32**(8), 1019-23.
- Santen, R.J., Song, R.X., Masamura, S., Yue, W., Fan, P., Sogon, T., Hayashi, S., Nakachi, K., Eguchi, H. 2008. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, **630**, 19-34.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P.B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Jakate, A.S., Creutzinger, V., Heubi, J.E. 2003. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr*, **133**(4), 1027-35.
- Setchell, K.D., Clerici, C., Lephart, E.D., Cole, S.J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B.E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N.M., Lund, T.D., Handa, R.J., Heubi, J.E. 2005. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr*, **81**(5), 1072-9.
- Shanle, E.K., Xu, W. 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol*, **24**(1), 6-19.
- Sigma-Aldrich. 2011. RPMI Media, Vol. 2011.
- Silva, E., Kabil, A., Kortenkamp, A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways--distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol*, **245**(2), 160-70.
- Siow, R.C., Mann, G.E. 2010. Dietary isoflavones and vascular protection: activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Mol Aspects Med*, **31**(6), 468-77.
- Taylor, C.K., Levy, R.M., Elliott, J.C., Burnett, B.P. 2009. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutr Rev*, **67**(7), 398-415.
-

- 
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T. 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, **227**(2), 115-24.
- Usui, T. 2006. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J*, **53**(1), 7-20.
- van Duursen, M.B., Nijmeijer, S.M., de Morree, E.S., de Jong, P.C., van den Berg, M. 2011. Genistein induces breast cancer-associated aromatase and stimulates estrogen-dependent tumor cell growth in in vitro breast cancer model. *Toxicology*, **289**(2-3), 67-73.
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, **731**, 237-45.
- Varani, J., Kelley, E.A., Perone, P., Lateef, H. 2004. Retinoid-induced epidermal hyperplasia in human skin organ culture: inhibition with soy extract and soy isoflavones. *Exp Mol Pathol*, **77**(3), 176-83.
- Virk-Baker, M.K., Nagy, T.R., Barnes, S. 2010. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Med*, **76**(11), 1132-42.
- Wan, H., Williams, R.L., Doherty, P.J., Williams, D.F. 1997. A study of cell behaviour on the surfaces of multifilament materials. *J Mater Sci Mater Med*, **8**(1), 45-51.
- Yamori, Y., Moriguchi, E.H., Teramoto, T., Miura, A., Fukui, Y., Honda, K.I., Fukui, M., Nara, Y., Taira, K., Moriguchi, Y. 2002. Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female Japanese immigrants in Brazil: a ten-week study. *J Am Coll Nutr*, **21**(6), 560-3.
- Zhan, S., Ho, S.C. 2005. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr*, **81**(2), 397-408.
- Zhao, E., Mu, Q. 2011. Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. *Sci Pharm*, **79**(1), 1-20.
- Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J. 2004. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci*, **74**(8), 935-68.