



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Diosgenina e derivados oxidados: potenciais agentes antitumorais e antifúngicos

Ana Isabel de Matos Antunes Rebelo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre  
Co-orientador: Prof. Doutora Luiza Granadeiro

Covilhã, Outubro de 2011



# Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Doutor Samuel Silvestre, por todo o seu apoio, paciência, aconselhamento e disponibilidade; sem o Professor não seria possível a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof. Doutora Luiza Granadeiro, pelas recomendações e ajuda prestada.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para tornar este trabalho melhor, em especial à Prof. Doutora Fernanda Domingues, à Dra. Filomena Silva, à Dra. Susana Ferreira e à Dra. Ana Ramalinho.

Aos meus colegas Ana Arquilino e Márcio Geraldês pela disponibilidade prestada.

À minha família e amigos que sempre estiveram presentes e nunca me deixaram desistir.



# Resumo

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade e acentuado impacto sócio-económico nos dias de hoje. Apesar dos enormes avanços científicos, a sua incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Actualmente são utilizados vários agentes químicos no tratamento dos tumores malignos. Contudo, a sua baixa eficácia e efeitos secundários severos e o aparecimento de resistências têm impulsionado a investigação no desenvolvimento de novos fármacos nesta área ao longo das últimas décadas. Assim, um dos objectivos deste trabalho é a descoberta de compostos com potencial acção anticancerígena.

A diosgenina é uma sapogenina esteróide, um dos principais constituintes bioactivos de várias plantas, e é encontrada em alimentos consumidos em todo o mundo. Além disso, é um dos principais precursores na produção industrial de vários esteróides sintéticos conhecidos. Este composto não é sintetizado metabolicamente nem convertido noutros esteróides no organismo humano e, portanto, tem sido considerado seguro. No entanto, alguns estudos têm indiciado que a diosgenina tem efeito estrogénico nos seres humanos, embora ainda não haja evidência concreta dessa acção. Assim, neste trabalho também foi avaliado o potencial de estrogenicidade deste composto, verificando-se que, nas nossas condições experimentais, a diosgenina não revelou ter acção estrogénica significativa.

Nos últimos anos, diversos estudos têm evidenciado a potencial acção anticancerígena da diosgenina, tendo-se demonstrado, que actua sobretudo através da inibição do ciclo celular e indução de apoptose. Considerando também que tem sido descrita acção antiproliferativa interessante para outros esteróides oxidados nos anéis A e B, foi avaliada a acção citotóxica da diosgenina e dos seus derivados oxidados 7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina. Os resultados por nós obtidos comprovam o interesse da diosgenina como potencial agente antitumoral e indicam que os seus derivados oxidados estudados parecem não ter vantagem significativa sobre a diosgenina neste âmbito. Contudo, a 7-oxodiosgenina, revelou interesse na medida em que se verificou acção antiproliferativa selectiva sobre as células MCF-7. Uma vez que também são escassos os estudos sobre os efeitos da diosgenina quando utilizada conjuntamente com outros fármacos anticancerígenos, efectuaram-se estudos da combinação deste composto com tamoxifeno e flutamida nas células MCF-7 e LNCaP, respectivamente. Adicionalmente, foram efectuados estudos de avaliação da acção antifúngica da diosgenina e dos referidos derivados oxidados em estirpes de *Candida* comerciais e clínicas, tendo-se concluído que estes compostos não revelaram ter acção anti-*Candida* nas condições experimentais realizadas.

**Palavras-chave:** diosgenina, antitumoral, antifúngico, estrogenicidade, 7-oxodiosgenina, 5,6-epoxidiosgenina, diosgenona, mama, próstata, fibroblastos



# Abstract

Cancer is a disease with high morbidity and mortality and severe socio-economic impact today. Despite the enormous scientific advances, its incidence has been increasing over the years. Currently various drugs are used in the treatment of malignant tumors. However, its low efficacy and severe side effects and the emergence of resistance have stimulated research in the development of new drugs in this area over the past decades. Thus, one of the aims of this work is the discovery of compounds with potential anticancer action.

Diosgenin is a steroidal sapogenin, a major bioactive constituent of various plants, and can be found in foods consumed throughout the world. Moreover, it is one of the main precursors in the industrial production of several known synthetic steroids. This compound is not synthesized or metabolically converted into other steroids in the human body and therefore has been considered safe. However, some studies have indicated that diosgenin has estrogenic effect in humans, although there is still no concrete evidence of that action. Thus, in this study the potential estrogenicity of this compound was also evaluated, and it was observed that in our experimental conditions, it was found that diosgenin have no significant estrogenic action.

In recent years, several studies have shown the potential anticancer action of diosgenin and it was demonstrated that it mainly acts by inhibiting cell cycle and apoptosis induction. Considering that it has been reported an interesting antiproliferative action in other steroids oxidized in rings A and B, we also evaluated the cytotoxic effect of diosgenin and its oxidized derivatives 7-oxodiosgenin, 5,6-epoxydiosgenin and diosgenone. The results obtained confirmed the interest of diosgenin as a potential antitumor agent and indicate that its oxidized derivatives that we studied appear to have no significant advantage over diosgenin in this area. However, 7-oxodiosgenin showed interest in that it was observed a selective antiproliferative action on MCF-7 cells. In addition, since there are only few studies on the effects of diosgenin when combined with other anticancer drugs, we have performed studies involving the combination of this compound with flutamide and tamoxifen in MCF-7 and LNCaP, respectively. Additionally, studies have been performed for the evaluation of the antifungal activity of diosgenin and its oxidized derivatives previously referred in commercial and clinical *Candida* strains and it was concluded that these compounds have not anti-*Candida* activity under the experimental conditions performed.

**Keywords:** diosgenin, antitumor, antifungal, estrogenicity, 7-oxodiosgenin, 5,6-epoxydiosgenin, diosgenone, breast, prostate, fibroblasts



# Índice

Lista de Figuras .....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Acrónimos.....	xv
I - Introdução .....	1
I.1. As saponinas esteróides e a sapogenina diosgenina .....	1
I.1.1. Estruturas, características físico-químicas e importância geral .....	1
I.1.2. Potenciais aplicações terapêuticas da diosgenina .....	3
I.2. Acção anticancerígena da diosgenina e derivados.....	4
I.2.1. Importância actual do cancro e terapêutica anticancerígena .....	4
I.2.2. Acção anticancerígena da diosgenina e mecanismos moleculares associados.....	5
I.2.3. Relação estrutura-actividade anticancerígena .....	10
I.2.4. Combinação da diosgenina com agentes anticancerígenos .....	12
I.3. Acção antifúngica da diosgenina e derivados .....	15
II - Objectivos .....	17
III - Materiais e Métodos .....	18
III.1. Compostos testados nas linhas celulares .....	18
III.2. Preparação das soluções dos compostos utilizados .....	18
III.2.1 - Diosgenina .....	18
III.2.2 - 17- $\beta$ -estradiol.....	18
III.2.3 - 7-Oxodiosgenina, diosgenona, 5,6-epoxidiosgenina.....	19
III.2.4 - Tamoxifeno e Flutamida .....	19
III.3. Culturas celulares.....	19
III.3.1 - NHDF.....	19
III.3.2 - MCF-7.....	20
III.3.3 - LNCaP .....	20
III.4- Técnicas usadas nas culturas celulares <i>in vitro</i> .....	21
III.4.1 - Congelamento e descongelamento de células .....	21
III.4.2 - Tripsinização .....	21
III.4.3 - Contagem de células .....	22
III.5 - Procedimento geral realizado para estudar o efeito dos compostos estudados na viabilidade celular.....	22
III.6 - Ensaio realizado para analisar a viabilidade celular .....	23
III.6.1- Ensaio de toxicidade (MTT) .....	23
III.7 - Análise estatística .....	24
III.8 - Procedimento geral realizado para estudar o efeito dos compostos diosgenina, 7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina na proliferação de fungos.....	25
IV - Resultados e Discussão.....	26
V - Conclusões .....	42
VI - Referências Bibliográficas.....	45



# Lista de Figuras

**Figura 1** - Estrutura geral das saponinas esteróides.

**Figura 2** - Estrutura química da diosgenina.

**Figura 3** - Esquema representativo da apoptose e necrose.

**Figura 4** - Mecanismos de apoptose.

**Figura 5** - Representação esquemática dos mecanismos de acção plausíveis da diosgenina a nível celular como agente anticancerígeno.

**Figura 6** - Reacções de oxigenação do colesterol.

**Figura 7**- Estrutura química da diosgenina e dos seus derivados diosgenona, 5,6-epoxidiosgenina e 7-oxodiosgenina.

**Figura 8** - Estrutura química do tamoxifeno.

**Figura 9** - Comparação da ligação do estradiol e do raloxifeno no receptor do estrogénio.

**Figura 10** - Estrutura química da flutamida.

**Figuras 11 e 12:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M durante 24h, com e sem recuperação com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT.

**Figuras 13 e 14:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M durante 48h, com e sem recuperação com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT.

**Figuras 15 e 16:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M durante 96h, com e sem recuperação com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT.

**Figuras 17 e 18:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com estradiol (10nM) durante 48h, com e sem recuperação com meios de culturas c/FBS, s/FBS e FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT.

**Figuras 19 e 20:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com estradiol em concentrações entre 0,01 e 100  $\mu\text{M}$ , durante 48h, com meio de cultura com FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT.

**Figuras 21 e 22:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 e 100  $\mu\text{M}$ , durante 48h, com meio de cultura com FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 23:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  durante 48h, com e sem recuperação com meio de cultura c/FBS e c/FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 24:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  durante 48h, com meio de cultura com FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 25:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, incubadas com tamoxifeno em concentrações entre 0,1 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$ , durante 48h, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 26:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, incubadas com tamoxifeno (T) e diosgenina (D) em concentrações entre 0,1 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  e 20 $\mu\text{M}$  e 30 $\mu\text{M}$ , respectivamente, durante 48h, determinada pelo ensaio MTT.

**Figuras 27 e 28:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com flutamida (F) e diosgenina (D) em concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  e 10 $\mu\text{M}$  e 20 $\mu\text{M}$ , respectivamente, durante 48h, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 29:** Viabilidade celular relativa das células NHDF, MCF-7 e LNCaP, incubadas com 7-oxodiosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  durante 48h, com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 30:** Viabilidade celular relativa das células NHDF, MCF-7 e LNCaP, incubadas com diosgenona em concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  durante 48h, com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT.

**Figura 31:** Viabilidade celular relativa das células NHDF, MCF-7 e LNCaP, incubadas com 5,6-epoxidiosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$  durante 48h, com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT.

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Actividades anticancerígenas da diosgenina.



# Lista de Acrónimos

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ApoE4	Apolipoproteína E4
AR	Receptor de androgénios
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	ciclooxigenase
D	Diosgenina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -Estradiol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ER	Receptor de estrogénios
F	Flutamida
FAS	Sintase dos ácidos gordos
FBS	Soro fetal bovino
FBS-CH	Soro fetal bovino extraído com charcoal activado
Gal	<i>D</i> -galactose
Glc	<i>D</i> -glicose
GlcA	<i>D</i> -ácido glicorónico
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
LOX	Lipoxigenase
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-kB	Factor nuclear <i>kappa</i> B
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblasts</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Prostaglandinas
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
REC	Recuperação
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

Rha	<i>L</i> -ramnose
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Saboraud Dextrose Agar</i>
SERM	Moduladores selectivos de receptores de estrogénios
T	Tamoxifeno
TX	Tromboxano
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
Xyl	<i>D</i> -xilose

# I - Introdução

## I.1. As saponinas esteróides e a sapogenina diosgenina

As saponinas são um grupo diversificado de compostos glicosídicos encontrados naturalmente em plantas comestíveis e não comestíveis que, além de possuírem uma ampla gama de propriedades benéficas para a saúde, são utilizados como precursores de fármacos na indústria farmacêutica (Raju, J. et al, 2009).

### I.1.1. Estruturas, características físico-químicas e importância geral

Dá-se o nome de saponinas (do latim “*sapon*” = sabão) a um grupo de glicoconjugados que se dissolve na água, diminuindo a sua tensão superficial de modo que, ao agitar-se a solução, se forma uma espuma abundante e relativamente estável. A estrutura das saponinas consiste numa porção oligossacarídea formada por hidratos de carbono como a *D*-glicose (Glc), *D*-galactose (Gal), *N*-acetilglucosamina, *D*-ácido glicorónico (GlcA), *D*-xilose (Xyl) ou *L*-ramnose (Rha) ligada a uma porção aglicona (não açúcar), insolúvel em água, chamada genericamente de sapogenina (furostanol ou espirostanol). Portanto, sapogenina é a porção não polar de uma saponina. Normalmente, nas saponinas, o oligossacarídeo está ligado na posição C-3 da sapogenina, mas também pode estar ligado nas posições C-27 (em saponinas esteróides) ou C-30 (em saponinas triterpenóides). A porção sacarídea pode ser linear ou ramificada, contendo 2 a 5 resíduos monossacarídicos (Raju, J. et al, 2009; Williams, J.R. et al, 2007; Guclu-Ustundag, O., et al, 2007). Na figura 1 está apresentado um esquema geral da estrutura de uma saponina esteróide (espirostanol).

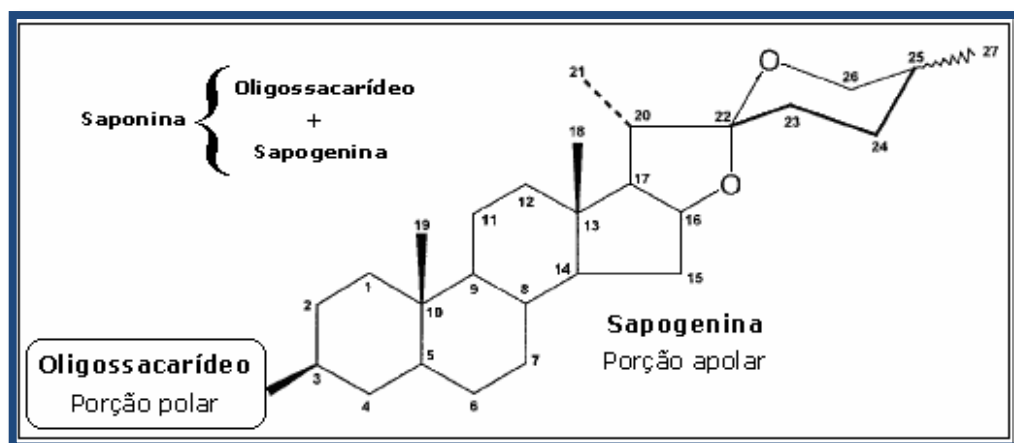


Figura 1 - Estrutura geral das saponinas esteróides. (Silva, M., 2008)

A natureza da aglicona e a porção oligossacarídica da molécula da saponina contribuem, naturalmente, para as propriedades físico-químicas e biológicas desta molécula. Existe uma extensa variedade de estruturas de saponinas, uma vez que tanto os locais de ligação da sapogenina e da porção oligossacarídica como a estereoquímica da ligação podem variar (Williams, J.R. et al, 2007). Além disso, a natureza da aglicona e dos seus grupos funcionais, bem como o número e a natureza dos açúcares podem ser muito distintos, o que contribui para a grande diversidade destes compostos (Guclu-Ustundag, O., et al, 2007; Price, K.R. et al, 1987).

As saponinas ocorrem em pelo menos 400 espécies de plantas pertencentes a 60 famílias diferentes (Guclu-Ustundag, O., et al, 2007). Está descrito que, nas plantas, as sapogeninas esteróides são biossintetizadas a partir do colesterol nelas presente através de uma série de etapas que incluem a hidroxilação, sendo posteriormente glicosiladas para formar as saponinas esteroidais. No entanto, desconhecem-se ainda todas as enzimas e os genes envolvidos na biossíntese destas moléculas (Kohara, A. et al, 2005).

A diosgenina é uma sapogenina esteróide que pode ser encontrada em diversas espécies vegetais, apresentando-se como um dos principais constituintes bioativos de várias plantas, nomeadamente do inhame ("*Dioscorea villosa*") (Raju, J. et al, 2009; Taylor W.G., et al, 2000). O inhame é oriundo de vários países de clima tropical, sendo muito abundante no México, tendo constituído, nesta região, a única fonte de matéria-prima para a produção de pílulas anticoncepcionais, desde 1950 até final dos anos 70 (Narula, A., et al, 2007).

Quimicamente, a molécula da diosgenina é composta por um grupo hidroxilo e uma ligação dupla nas posições C-3 e C-5, respectivamente. Além disso, tem seis anéis na sua constituição: A, B, C e D (sistema ciclopentanofenantreno, característico dos esteróides) e anéis E e F. Os anéis E (tetrahydrofurano) e F (tetrahydropirano) são fundidos na posição C-22 formando uma estrutura espiro. Estes grupos funcionais, ligações e anéis são fundamentais na conversão estrutural da diosgenina, originando outros compostos farmacologicamente activos (Quan, H., et al, 2005). A Figura 2 representa a estrutura química da diosgenina.

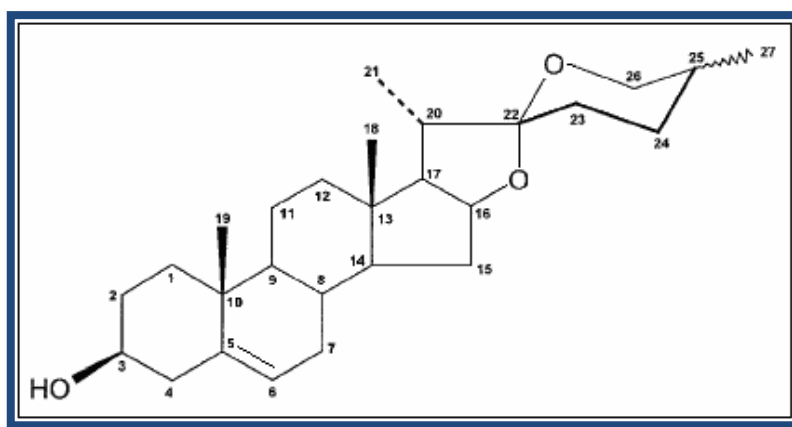


Figura 2 - Estrutura química da diosgenina. (Raju, J. et al, 2009)

A diosgenina é usada como um precursor químico na preparação industrial de muitos esteróides sintéticos, incluindo pílulas anticoncepcionais orais e corresponde a cerca de 50% da matéria-prima utilizada na produção de cortisona, progesterona e muitas outras hormonas esteróides (Raju, J., et al, 2009). Uma vez que a diosgenina é o precursor para a síntese industrial em larga escala de diferentes hormonas entre elas a progesterona, acreditou-se, a princípio, que poderia ser convertida em progesterona e outros esteróides sexuais *in vivo*. Contudo, a síntese comercial da progesterona a partir da diosgenina envolve múltiplas etapas complexas. Portanto, é pouco provável que a conversão metabólica da diosgenina em vários esteróides sexuais ocorra *in vivo* (Au, A.L.S., et al, 2004).

A diosgenina não é sintetizada metabolicamente nem convertida noutros esteróides no organismo humano e, por isso, tem sido considerada segura. No entanto, alguns estudos têm indiciado que este composto tem efeito estrogénico nos seres humanos, embora ainda não haja evidência concreta dessa acção (Raju, J., et al, 2009; Komesaroff P.A., et al, 2001).

### **I.1.2. Potenciais aplicações terapêuticas da diosgenina**

Uma característica importante da diosgenina é a sua vasta aplicação terapêutica em diferentes áreas. Em alguns países, alimentos naturais que contêm diosgenina foram divulgados como sendo eficazes no tratamento de doenças, tais como a osteoporose e tensão pré-menstrual em mulheres, possivelmente devido à sua potencial acção estrogénica acima referida (Noguchi, E., et al, 2006).

Em estudos em ratos diabéticos foi também demonstrado que a diosgenina tem propriedades hipoglicémicas, alterando a sua morfologia intestinal, diminuindo os seus níveis de glicose sanguíneos e melhorando o seu perfil lipídico (McAnuff-Harding, M.A., et al, 2006).

Adicionalmente, foi demonstrado que a diosgenina retarda a progressão da osteoporose e possui efeitos anti-inflamatórios em ratos (Au, A.L.S., et al, 2004). Os efeitos anti-inflamatórios e estrogénicos da diosgenina acima mencionados foram previamente sugeridos devido à similaridade estrutural da molécula com os estrogénios. A utilização de diosgenina mostrou ser potencialmente útil para a manutenção de níveis saudáveis de colesterol no sangue e impediu significativamente a perda óssea na mesma extensão que o estrogénio (Yen, M.L., et al, 2005).

A diosgenina pode ser convertida quimicamente em várias hormonas que estão presentes no corpo humano, tais como progesterona, aldosterona, cortisol e estrogénio, através de várias reacções enzimáticas (Hsu, K., et al, 2008; Tucci M., et al, 2003). Assim, a diosgenina tem sido amplamente utilizada na terapia hormonal de substituição de estrogénio nas

mulheres com menopausa (Hsu, K., et al, 2008; Benghuzzi H., et al, 2003). Contudo, existe pouca informação disponível relativa à eficácia e segurança na utilização de produtos naturais, incluindo a diosgenina, na terapêutica de substituição hormonal na menopausa (Hsu, K., et al, 2008). Para averiguar e confirmar os possíveis efeitos estrogénicos da diosgenina, os investigadores têm recorrido a modelos animais. Nestes estudos, observou-se que a diosgenina estimula o crescimento do epitélio mamário (Chen, J.H., et al, 2008; Aradhana R., et al, 1992), inibe o aumento de peso em ratos fêmea ovariectomizadas (Chen, J.H., et al, 2008; Scott A., et al., 2000) e contribui para a proliferação do epitélio vaginal (Joseph L., 1999).

Foi demonstrada uma actividade biológica interessante da diosgenina em consumidores de drogas opiáceas (tais como a morfina e a heroína), com infecção por VIH e portadores de um gene específico, ApoE4, que apresentam um maior risco de desenvolver demência: a diosgenina, juntamente com a substância *L*-deprenil, tem um potencial terapêutico nesta população (Turchan-Cholewo, J., et al, 2006).

## **I.2. Acção anticancerígena da diosgenina e derivados**

### **I.2.1. Importância actual do cancro e terapêutica anticancerígena**

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade e enorme impacto sócio-económico nos dias de hoje. No entanto, apesar dos enormes avanços científicos, a sua incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos. A sua prevenção e tratamento é um dos maiores desafios médicos da actualidade, tendo-se verificado avanços significativos nas últimas décadas (Barros, H., et al, 2006)

As estratégias seguidas clinicamente no tratamento de tumores malignos incluem a utilização de agentes antiproliferativos sistémicos que destroem preferencialmente as células malignas (Bracke, M.E., et al, 2008; Komen, J., et al, 2008; Marsh, S., et al, 2009; Xu, G., et al, 2001). Contudo, geralmente estes fármacos não são selectivos para células cancerígenas e a sua eficácia terapêutica fica limitada, uma vez que podem provocar danos a células e tecidos normais. As terapias convencionais causam significativos efeitos colaterais e frequentemente têm uma taxa de sucesso limitada devido a vários factores como concentração insuficiente do agente químico, elevada toxicidade sistémica e ausência de selectividade, além de contribuírem para a resistência dos tumores aos anticancerígenos após tratamento prolongado. Para superar tais limitações, têm sido desenvolvidas estratégias para que estes

agentes possam ser activados selectivamente no tecido tumoral. (Xu, G., et al, 2001) Desta forma, estudos com substâncias naturais podem colaborar para o maior entendimento da capacidade das mesmas em permitir a modulação de sinais de apoptose, possuindo, deste modo, uma potencial acção anticancerígena (Nobili, S., et al, 2009).

Actualmente, tem sido dado ênfase significativo à potencial utilização terapêutica de substâncias naturais presentes, designadamente, em frutas, leguminosas ou óleos essenciais de origem vegetal (Farr, D. R., 1997; Wang, H., 1997; Kitts, D.D., et al., 2000). Neste contexto, tem sido demonstrado que estas substâncias podem constituir uma alternativa válida na prevenção do cancro ou até como agentes terapêuticos, induzindo a morte celular programada, contrariamente ao que ocorre com a maioria das terapias utilizadas actualmente (Son, Y.O., et al., 2003). As terapias oncológicas convencionais incluem fármacos que são citotóxicos e pouco selectivos nos seus efeitos, sendo tóxicos para as células normais e, assim, provocando no paciente inúmeras reacções adversas (Arkin, M., 2005). Deste modo, em muitos estudos tem sido avaliada a potencial utilização de substâncias naturais em determinados tipos de cancro, com o objectivo de identificar agentes anticancerígenos, porém mais selectivos (Dumont, P., et al., 2007).

### **1.2.2. Acção anticancerígena da diosgenina e mecanismos moleculares associados**

Nos últimos anos, diversos estudos pré-clínicos têm evidenciado os efeitos anticancerígenos, quimiopreventivos e antiproliferativos, da diosgenina, tendo-se demonstrado, em várias linhas de células humanas cancerígenas, que actua principalmente através da inibição do ciclo celular e indução de apoptose (Raju, J., et al, 2009). Estes resultados têm implicado significativamente a potencial utilização deste composto como um novo agente terapêutico contra vários tipos de cancro. Os estudos desenvolvidos têm evidenciado que o efeito anticancerígeno da diosgenina não envolve um único mecanismo mas sim envolve vários alvos moleculares, que inclusivamente variam de acordo com o tipo de célula (Raju, J., et al, 2009). Assim, tem havido um esforço considerável na avaliação do papel da diosgenina na modulação do crescimento e proliferação de vários tipos de tumores humanos e na avaliação do seu potencial mecanismo de acção.

Neste contexto, vários estudos têm evidenciado, designadamente, que a diosgenina:

- inibe a proliferação de células do tipo osteossarcoma (tumor ósseo) pela indução da apoptose e interrupção do ciclo celular na fase G<sub>1</sub> (Moalic, S., et al, 2001; Corbière, C., et al, 2003; Trouillas, P., et al, 2005);
- pode inibir a proliferação de células do cancro da mama através da indução da proteína pró-apoptótica p53 (células MCF-7 positivas para o receptor de estrogénio) (Li, J., et al, 2005) ; nas células de cancro da mama MDA (negativas para o receptor de estrogénio) o mecanismo pró-apoptótico envolve a activação da caspase-3 (Sowmyalakshmi, S., et al, 2005);

- induz a apoptose em células do tipo eritroleucemia humana (Leger, D.Y., et al, 2004);  
 - inibe o crescimento e induz a apoptose na linhagem celular do cancro do cólon humano (Raju, J., et al, 2004). Na tabela 1, estão resumidas as actividades anticancerígenas da diosgenina.

**Tabela 1** - Actividades anticancerígenas da diosgenina. Legenda: AOM, azoximetano; NF- $\kappa$ B, factor nuclear k-B; Bcl-2, células B-2 linfoma não-Hodgkin; PARP, poli polimerase (adenosina ribose-difosfato). Adaptado de (Raju, J., et al, 2009)

Efeitos nas células	Regulação Bloqueio (X) Aumento(↑) Diminuição(↓)	Células/Modelos cancerígenos
<i>Estudos in vivo de Tumorigénese</i> Tumores cólon	↓	Modelo cancerígeno AOM-induzido de rato
<i>Estudos in vitro de inibição da proliferação celular</i>	X	Células KBM-5 leucemia mielogénica
	X	Células MCF-7 cancro da mama
	X	Células MDA cancro da mama
	X	Células 1547 osteossarcoma
	X	Células HT-29 carcinoma cólon
	X	Células HCT-15 carcinoma cólon
	X	Células HCT-116 carcinoma cólon
	X	Células K562 leucemia Células HEL eritroleucemia
<i>Modulação do ciclo celular</i> Fase Sub-G1 Fase G1 Fase G2/M	X X X	Células KBM-5 leucemia mielogénica Células 1547 osteossarcoma Células HEL eritroleucemia
<i>Efeitos proapoptóticos</i> Activação de p53	↑	Células MCF-7 cancro da mama
	↑	Células 1547 osteossarcoma
	↑	Células M4Beu melanoma
	↑	Células HEp-2 laringocarcinoma
<i>Activação de NF-<math>\kappa</math>B</i>	↑	Células KBM-5 leucemia mielogénica
	↑	Células 1547 osteossarcoma
<i>Expressão de p21</i>	↑	Células HEL eritroleucemia
	↑	Células HCT-116 carcinoma cólon
<i>Activação de Caspase-3</i>	↑	Células HT-29 carcinoma cólon
	↑	Células MDA cancro da mama
	↑	Células K562 leucemia
	↑	Células HEL eritroleucemia
<i>Modulação de Bcl-2</i>	↓	Células HT-29 carcinoma cólon
	↓	Células MDA cancro da mama
<i>Clivagem PARP</i>	↑	Células HCT-116 carcinoma cólon
	↑	Células HEL eritroleucemia
	↑	Células K562 leucemia

Como já foi referido, o principal mecanismo anticancerígeno da diosgenina envolve a perturbação do ciclo celular e a indução da apoptose. Múltiplos sinais modulam a proliferação celular, sobrevivência e morte celular e estas acções coordenadas permitem que a célula normal cresça e se divida até à sua senescência (Foster, I., 2008). Entretanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrolo da proliferação e ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. De um modo geral, estímulos tóxicos ou prejudiciais para a célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (Foster, I., 2008; Bayly, A.C., et al, 1997; Cotran, R.S., et al, 2000; Kuwana, T., et al, 2003).

A apoptose é um processo fisiológico altamente regulado de morte celular programada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos. Este processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância, designadamente, para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (Bergantini, A.P., et al, 2005; Bras, M., et al, 2005).

A apoptose é caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contracção celular, fragmentação do ADN e condensação da cromatina levando à formação de núcleos picnóticos e vesículas sem perda da integridade da membrana e sem resposta inflamatória (Lavin, M.R, 1993; Liao, X., et al, 2005; Yasuhara, S., et al, 2003) (Fig. 3). A apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, efectora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte (por exemplo, stress oxidativo, erros no DNA, desequilíbrio iónico e presença de citocinas). Esta primeira fase pode influenciar a eficácia das fases seguintes (efectora e de degradação). Na fase efectora há activação da cascata de caspases, constituída pela activação de proteases, nucleases e de outros intermediários que participam nesta fase. Na fase de degradação, a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas características deste processo, tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Green, D., et al, 1998).(Fig. 4).

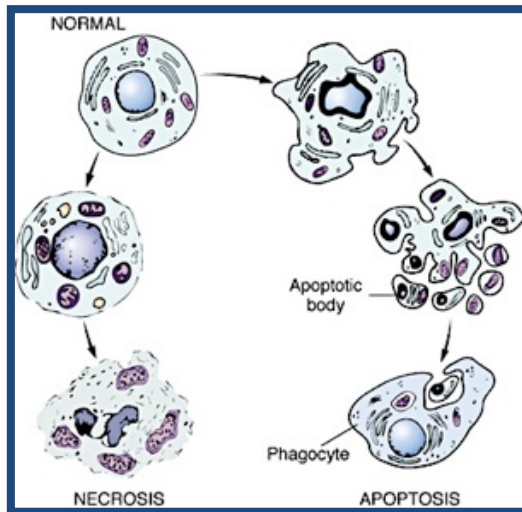


Figura 3- Esquema representativo da apoptose e necrose. (Ferreira, C.G., 2004)

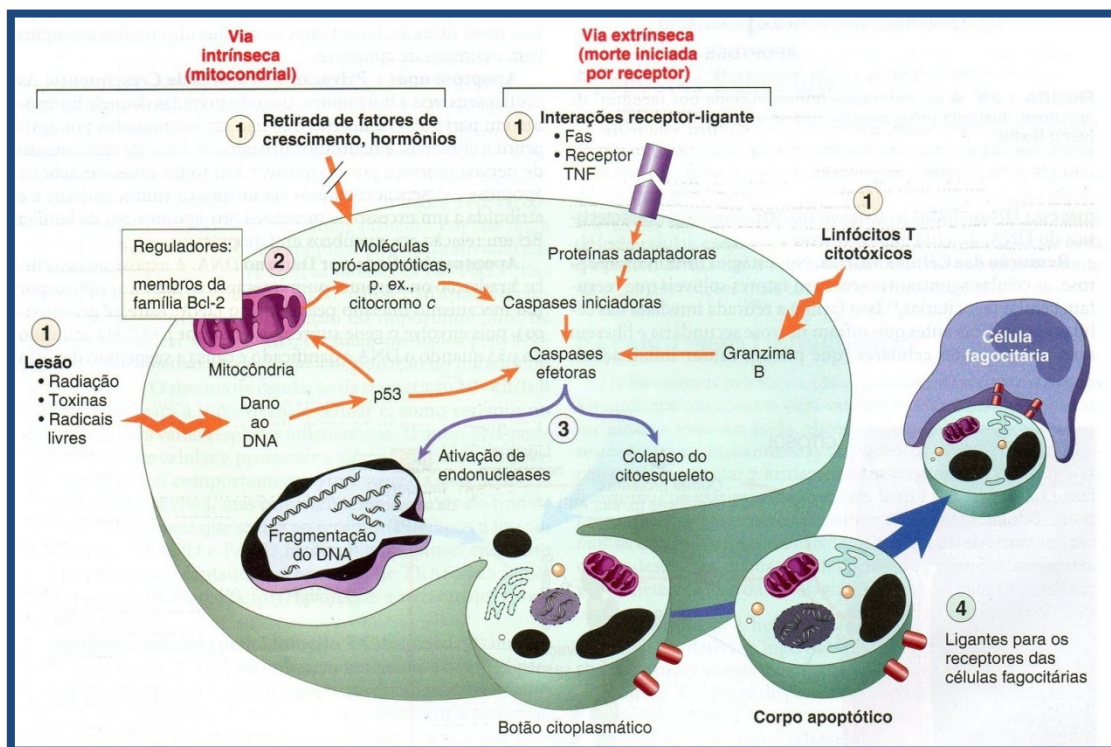


Figura 4- Mecanismos de apoptose. (Robbins & Cotran, 2009)

Múltiplos estudos têm evidenciado o envolvimento da diosgenina na modulação dos processos que envolvem as enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). Estes dois sistemas são responsáveis pela biossíntese dos eicosanóides (Furstenberger, G., et al, 2006). A enzima COX-2 participa na conversão do ácido araquidónico (AA) em prostaglandinas (PG) e tromboxano (TX) A<sub>2</sub> e o envolvimento desta enzima em processos inflamatórios e na carcinogénese é bem conhecido (Raju, J., et al, 2009). Alguns investigadores demonstraram que a diosgenina inibe a actividade e expressão da enzima COX-2 nas células 1547, de osteossarcoma (Moalic, S., et al, 2001). Pelo contrário, nas células HEL da eritroleucemia, a diosgenina induz o aumento da síntese de AA, o que leva a um acréscimo na expressão de COX-2 que é acompanhado da indução da apoptose celular (Leger, D.Y., et al, 2004). Por outro lado, nas células K562 de leucemia deficientes em COX-2, a diosgenina induz apoptose independente de COX-2 através da activação da cinase MAP p38 e da inibição da ligação de NFκB (Liagre, B., et al, 2005). O sistema LOX inclui um grupo de isozimas que participa activamente na conversão de AA em leucotrienos. Tal como a enzima COX-2, a 5-LOX é uma enzima induzível implicada na carcinogénese. Assim, a inibição destas enzimas revelou ser fundamental na actividade de vários agentes anticancerígenos (Chen X., et al, 2006). Neste contexto, em estudos com células HEL observou-se que o tratamento com diosgenina não afecta o mRNA da 5-LOX ou o mRNA da proteína activadora da enzima 5-LOX a nível transcripcional. Contudo, quando as células HEL estão em processo de diferenciação e são incubadas com diosgenina na presença de um inibidor da COX (indometacina), o efeito inibitório de crescimento da diosgenina é revertido e, assim, observa-se um crescimento cinético exponencial de células indiferenciadas (Nappez, C., et al, 1995). Estes estudos sugerem que a actividade quimiopreventiva da diosgenina contra vários tipos de cancro pode incluir a inibição de um ou ambos os sistemas acima mencionados de uma maneira conjunta ou independente (Raju, J., et al, 2009).

A regulação de enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos gordos tem se revelado muito importante na patogénese do cancro. A enzima lipogénica FAS (síntase de ácidos gordos) tem uma função oncogénica, uma vez que confere vantagens de sobrevivência e crescimento de células cancerígenas (Menendez, J.A., et al, 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que a diosgenina, que também é um conhecido agente hipolipidémico (Raju, J., et al, 2009); inibe a expressão de FAS nas células HER2 de cancro da mama (Chang C.T., et al, 2007). Este facto sugere que a enzima FAS pode ser um potencial alvo molecular da diosgenina noutros tipos de células cancerígenas que apresentem uma expressão abundante de FAS. Relativamente à via de síntese do colesterol, foi demonstrado que a sobrerregulação de moléculas envolvidas nesta via leva a uma estimulação da síntese de ADN no processo de carcinogénese (Rao, K. N., 1995; Cerda, S.R., et al, 1995). De facto, a expressão e actividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) está aumentada nas células cancerígenas quando comparada com células de tecidos normais (Caruso, M.G., et al, 2005; Notarnicola, M., et al, 2004). Neste contexto, a potencial actividade moduladora da HMG-CoA redutase pela diosgenina foi também estudada. Nas células humanas HCT-116 do carcinoma

do cólon, doses inibitórias de diosgenina suprimem a expressão tanto do mRNA como da proteína HMG-CoA redutase, sugerindo que o modo de acção anticancerígena da diosgenina pode, portanto, envolver a via de síntese do colesterol (Raju, J., et al, 2007).

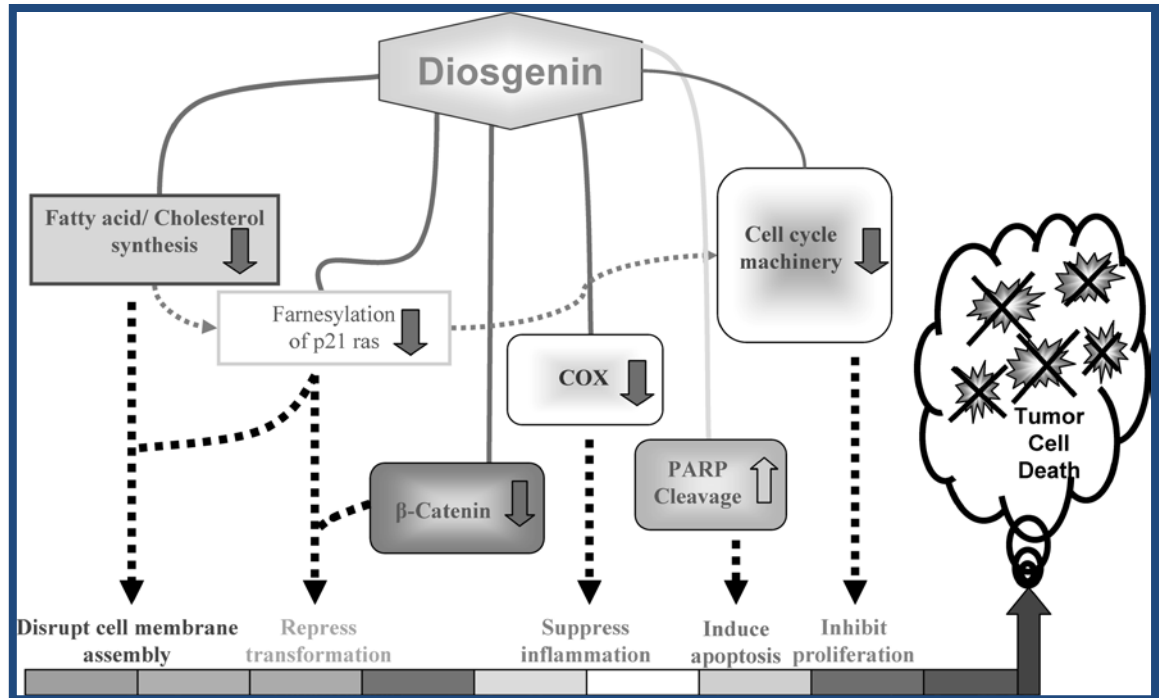


Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de acção plausíveis da diosgenina a nível celular como agente anticancerígeno. A diosgenina, em doses subcrónicas, actua nas células tumorais para reprimir a sua transformação, induzir apoptose, suprimir a proliferação e crescimento e diminuir a integridade da membrana celular, levando à morte da célula cancerígena. COX, cicloxigenase; PARP, poli polimerase (adenosina ribose-difosfato) (Raju, J. et al, 2009)

### 1.2.3. Relação estrutura-actividade anticancerígena

A avaliação da relação estrutura-actividade da diosgenina na proliferação de células cancerígenas é da maior importância no sentido de se potenciar a sua acção quimiopreventiva e antiproliferativa. Alguns investigadores conseguiram calcular, através de modelagem molecular, a conformação espacial e a capacidade de transferência de electrões da molécula da diosgenina, com o intuito de relacionar as suas características estruturais com os efeitos que a mesma pode originar na taxa de proliferação celular, distribuição do ciclo celular e indução de apoptose nas células 1547 de osteossarcoma. Assim, neste tipo de tumor, a actividade anticancerígena da diosgenina parece estar relacionada com a presença de uma porção hetero de açúcar (cadeia lateral) e uma dupla ligação 5,6 na sua estrutura. Além disto, a conformação estrutural (estereoquímica) nos átomos de carbono C-5 e C-25 revelou ser importante na actividade biológica da diosgenina (Raju, J., et al, 2009).

Alguns estudos revelaram que derivados espirostanos, sintetizados a partir da diosgenina, possuem actividade anticancerígena quando avaliados em células HCT 116 de carcinoma colo-rectal humano. Exemplos destes compostos são, entre outros, a solasodina (possui um átomo de azoto no anel F) e a diosgenona (possui uma cetona insaturada no anel A). Neste estudo, constatou-se que a presença de um átomo de azoto no anel F parece estar associada à eficácia do composto na sua actividade anticancerígena. Além disso, os derivados espirostanos que não possuem um sistema conjugado no anel A apresentam melhor actividade biológica. Num outro estudo, os efeitos citotóxicos de alguns derivados espirostanos foram avaliados usando culturas celulares de hepatócitos e fibroblastos V79 através de vários ensaios de viabilidade. Os referidos derivados foram obtidos por modificação dos anéis A e B da diosgenina, e observou-se que havia toxicidade superior para os fibroblastos do que para os hepatócitos (Melo, P.S., et al, 2004).

O colesterol difere da diosgenina apenas na cadeia lateral ligada ao anel D. Tal como na diosgenina, existem diversos estudos em que se funcionalizou a molécula do colesterol com o objectivo de desenvolver compostos com potencial acção antitumoral - neste contexto, um exemplo importante são os oxisteróis. Estes compostos são produtos resultantes da oxidação do colesterol, que pode ser espontânea ou enzimática (Vejud, A., et al, 2008; Guardiola, F., et al, 2002; Smith, L., 1990). A auto-oxidação do colesterol no anel B origina a formação de 7 $\alpha$  e 7 $\beta$ -hidroxicolesteróis, 7-oxocolesterol, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxicolesterol, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxicolesterol e colestano-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (Vejud, A., et al, 2008). Vários estudos efectuados indicam que os oxisteróis são fortes indutores de apoptose em vários tipos de linhas celulares e por isso têm sido sugeridos como potenciais agentes anticancerígenos (Vejud, A., et al, 2008; Prunet, C., 2005; Lizard, G., et al, 1999).

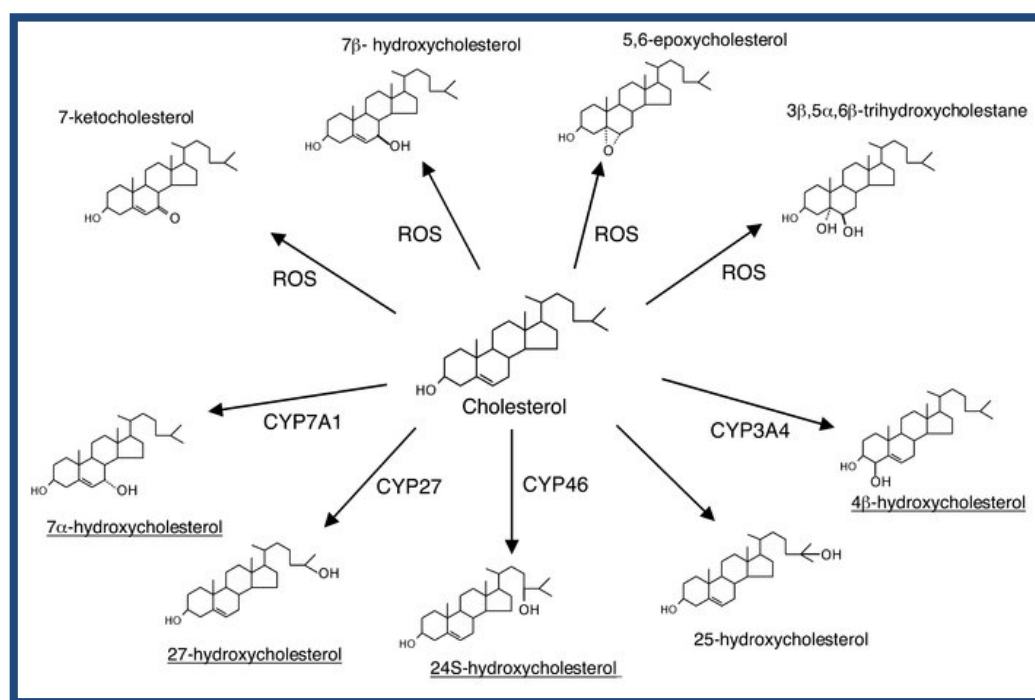


Figura 6 - Reacções de oxigenação do colesterol (Bjorkhem, I., 2002)

Deste modo, tendo em consideração toda a actividade antitumoral acima descrita para os derivados do colesterol oxidados nos anéis A e B e para o potencial interesse antitumoral da diosgenina, torna-se importante avaliar a acção citotóxica/antiproliferativa de vários derivados oxidados da diosgenina, designadamente 7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina (representados na figura 7).

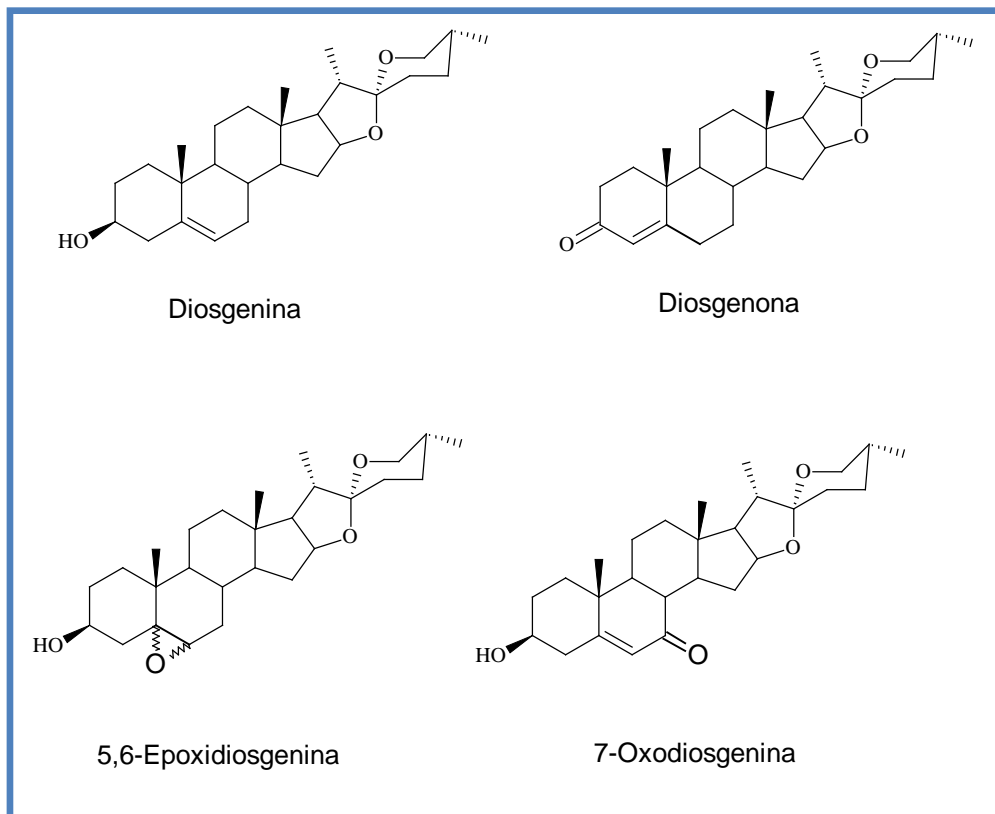


Figura 7 - Estrutura química da diosgenina e dos seus derivados diosgenona, 5,6-epoxidiosgenina e 7-oxodiosgenina

#### 1.2.4. Combinação da diosgenina com agentes anticancerígenos

Uma vez que não são conhecidos muitos estudos sobre os efeitos da diosgenina em combinação com outros fármacos anticancerígenos clássicos (Chang, C.T. et al, 2007), torna-se também importante abordar esta temática.

Um dos fármacos amplamente utilizado no tratamento do cancro da mama, como terapia adjuvante, é o tamoxifeno. Este fármaco é um antiestrogénio não esteróide, com actividade agonista ou antagonista nos receptores de estrogénio, dependente da selectividade dos tecidos. O tamoxifeno é um derivado trifeniletileno substituído que se apresenta na forma de isómeros *cis* e *trans*. O isómero *trans* pode ser usado como agente antitumoral no cancro da

mama, tanto em mulheres como homens; agente preventivo na redução do risco de desenvolvimento de cancro da mama em mulheres de elevado risco; agente preventivo na redução do risco de desenvolvimento de cancro da mama em mulheres com Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS); agente preventivo na redução do risco de desenvolvimento de cancro contralateral em mulheres com cancro unilateral e agente de fertilização. Por outro lado, o isómero *cis* é carcinogénico, o que exige um controlo e purificação rigorosos da molécula, visto que este isómero pode estar associado a alguns efeitos secundários (Kute, D.W., et al, 2003).

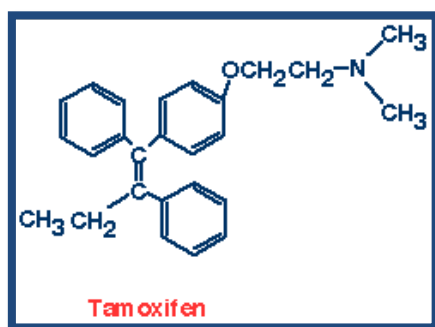


Figura 8- Estrutura química do tamoxifeno.  
(<http://www.ovc.uoguelph.ca>)

O mecanismo de acção antineoplásica ainda não é totalmente conhecido, mas tem sido relacionado com o bloqueio dos receptores estrogénicos (RE), impedindo a acção das moléculas esteróides, responsáveis pela proliferação das células cancerígenas. Quando os estrogénios se ligam aos RE, são completamente envolvidos pelo seu domínio hidrofóbico, através da reposição da hélice 12, que sela o esteróide dentro da bolsa hidrofóbica. Os co-activadores responsáveis pela acção estrogénica podem-se então ligar à região AF2 da hélice 12 (Fig. 9-A). Os moduladores selectivos de receptores de estrogénio (SERMs), como o tamoxifeno ou o raloxifeno, possuem um grupo volumoso que impede o reposicionamento da hélice 12, através da ligação ao Asp351, ficando o RE numa conformação aberta. A hélice 12 é deslocada para fora, escondendo a região AF2, não permitindo a ligação dos co-activadores - acção antiestrogénica (Kute, D.W., e tal, 2003; Jordan, V.C., 1999) (Fig.9-B).

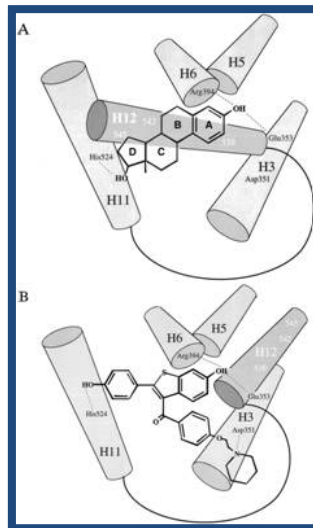


Fig. 9: Comparação da ligação do estradiol (A) e do raloxifeno (B) no receptor do estrogénio. (Jordan V.C., 1999)

O tamoxifeno exerce também uma fraca acção estrogénica em alguns tecidos, sendo responsável pela promoção de certos tipos de tumores (como por exemplo cancro da próstata e do endométrio). Esta acção do tamoxifeno pode estar relacionada com o facto de este fármaco impedir apenas a região AF2, deixando a região AF1 exposta para ligação a co-activadores estrogénicos num ambiente propício. Supõe-se que exista uma distribuição diferencial de co-activadores e co-repressores nos diferentes tipos de tecido, resultando nos diferentes tipos de resposta do complexo tamoxifeno-RE (Kute, D.W., e tal, 2003; Jordan V.C., 1999).

A flutamida é um fármaco antiandrogénico não esteróide, destituído de actividade hormonal, utilizado no tratamento do cancro avançado de próstata, em monoterapia ou em combinação com outros agentes.<sup>[83]</sup>

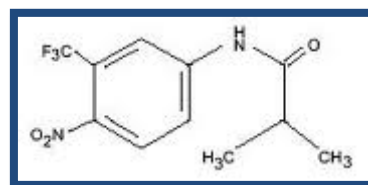


Figura 10- Estrutura química da flutamida. (Marona, H., et al, 2004)

Os antiandrogénicos são compostos desenvolvidos com a finalidade de bloquear a acção de androgénicos de origem supra-renal e testicular nos tecidos alvo, sem reduzir os níveis de testosterona. Embora a orquiectomia (remoção cirúrgica de parte do testículo), a administração de estrogénios ou de agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH), como, por exemplo, a leuprolida ou a goserelina, promovam a redução de 90% a 95% na concentração de testosterona no sangue, a concentração intraprostática da

diidrotestosterona decresce apenas 50% a 60%, indicando que as glândulas supra-renais são responsáveis por apenas 40% a 50% da di-hidrotestosterona total na próstata do homem (Marona, H., et al, 2004; Labrie, F., et al, 1985). A flutamida e seus metabolitos, principalmente a 2-hidroxi-flutamida, actuam inibindo a ligação da testosterona ou da di-hidrotestosterona aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células alvo. No entanto, estudos demonstram uma pequena correlação entre a afinidade relativa de ligação do fármaco aos receptores androgénicos e a proliferação celular, o que sugere que o seu efeito benéfico não se deve à interacção directa com as células tumorais (Brodgen, R., et al, 1985). A afinidade da 2-hidroxi-flutamida ao receptor androgénico parece ser 20 vezes maior que a da flutamida (Marona, H., et al, 2004).

Alguns estudos evidenciaram que a combinação de derivados de fitoesteróis com agentes anticancerígenos clássicos (cisplatina e doxorubicina) poderá reduzir a dose clínica normalmente administrada destes agentes anticancerígenos no tratamento do cancro do cólon humano, com a vantagem de se reduzirem os efeitos colaterais associados a esses fármacos (Carvalho, J., et al, 2010). Outro tipo de estudo revelou que a sobreexpressão da cinase HER2 pode induzir resistência aos agentes quimioterapêuticos em células do cancro da mama (Yu, D., et al, 1996) e que a inibição da sintase dos ácidos gordos (FAS) pode sensibilizar as células cancerígenas que sobreexpressam HER2 para os efeitos do anticancerígeno paclitaxel (Menendez, J.A., et al, 2005). Uma vez que a diosgenina pode inibir a expressão de FAS nas células cancerígenas acima mencionadas, constatou-se, neste estudo, que a diosgenina pode assim incrementar a citotoxicidade do fármaco paclitaxel (Chang C.T., et al, 2007). Deste modo, poderá existir uma melhoria no *ratio* entre os benefícios terapêuticos e os efeitos adversos, muitas vezes associados a este tipo de fármacos quimioterapêuticos.

### **I.3. Acção antifúngica da diosgenina e derivados**

As infecções oportunistas provocadas por fungos pertencentes aos géneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, constituem um sério problema para pacientes imunocomprometidos (Yang, C.R., et al, 2006). A terapêutica antifúngica utilizada actualmente inclui, maioritariamente, cinco classes de fármacos: os polienos (ligam-se ao ergosterol na membrana celular provocando perda da integridade da mesma e instabilidade osmótica), os azóis (inibem as enzimas citocromo P450 dependentes, impedindo a síntese de ergosterol e esgotando o mesmo na membrana do fungo), as alilaminas (inibem a enzima epoxidase na via de síntese do ergosterol), as equinocandinas (inibem a síntese de  $\beta$ -1,3-glucano que está presente na parede celular dos fungos) e as flucitosinas (agem como um anti metabolito do uracilo na síntese do RNA do fungo). Os fármacos representativos destas cinco classes são a anfotericina B, o fluconazol, a terbinafina, a caspofungina e a flucitossina, respectivamente. No entanto, tem-se vindo a demonstrar algumas limitações destes fármacos, como por exemplo, o aparecimento de resistências aos azóis ou a falta de eficácia

da caspofungina no tratamento do fungo *Cryptococcus* (Yang, C.R., et al, 2006). Torna-se, deste modo, importante a descoberta de novos agentes antifúngicos que possuam modos de acção mais eficazes.

Tem sido descrito na literatura que algumas saponinas esteróides possuem actividade antifúngica, particularmente contra agentes patogénicos provenientes de ambientes rurais.<sup>[89]</sup> A actividade antifúngica das saponinas esteróides está associada com as características individuais da aglicona constituinte e com o número e estrutura das unidades monossacarídicas das cadeias de açúcar (Yang, C.R., et al, 2006). Atendendo à estrutura da aglicona e possuindo a mesma sequência de açúcares ligados ao C-3, alguns investigadores constataram actividade antifúngica nos derivados espirostanos, contrariamente aos derivados furostanos que não possuíam nenhuma actividade. Estes dados confirmam que os anéis E e F da diosgenina desempenham um importante papel nas suas propriedades antifúngicas (Sautour, M., et al, 2004). Recentemente, foi demonstrado que vários derivados oxidados do colesterol nos anéis A e B, nomeadamente o 7-oxocolesterol, evidenciaram acção contra *Candida albicans* resistente a miconazole e anfotericina B, bem como noutras estirpes de *Candida*. Neste estudo, verificou-se que a presença de um grupo cetona na estrutura do 3,7-colestano parece ser necessária para melhorar esta actividade biológica da molécula e que os derivados 7-oxidados revelaram actividade significativa contra *Candida albicans* (Brunel, J.M., et al, 2005). Deste modo, atendendo ao papel desempenhado pelos anéis E e F da diosgenina na sua acção antifúngica e pela potencial actividade anti-*Candida* de derivados oxidados nos anéis A e B do colesterol, torna-se importante avaliar a acção de derivados da diosgenina oxidados nos anéis A e B também neste contexto.

## II - Objectivos

Este trabalho tem como objectivo principal avaliar os efeitos da diosgenina e derivados oxidados na proliferação de células de vários tipos comuns de cancros e na proliferação de fungos.

Para alcançar este objectivo desenvolveram-se os seguintes estudos:

- Optimização dos protocolos experimentais para a determinação da viabilidade celular;
- Avaliação da acção da diosgenina e derivados oxidados (7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina) na proliferação/viabilidade celular de fibroblastos da derme humana não cancerígenos (NHDF), células epiteliais humanas de cancro da mama (MCF-7) e células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP);
- Avaliação da acção isolada dos fármacos Tamoxifeno e Flutamida e da acção combinada destes com a diosgenina, na proliferação/viabilidade de células epiteliais humanas de cancro da mama (MCF-7) e células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), respectivamente;
- Avaliação da acção da diosgenina e derivados oxidados (7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina) na proliferação de várias estirpes de *Candidas* - *Candida albicans* ATCC 90028 (estirpe comercial), *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida lusitaniae* (estirpes clínicas).

## III - Materiais e Métodos

### III.1. Compostos testados nas linhas celulares

- Diosgenina, Sigma Aldrich (Portugal);
- 17- $\beta$ -estradiol, Sigma Aldrich (Portugal);
- 7-oxodiosgenina (sintetizado e caracterizado pelo Professor Samuel Silvestre);
- Diosgenona (sintetizado e caracterizado pelo Professor Samuel Silvestre);
- 5,6-epoxidiosgenina (sintetizado e caracterizado pelo Professor Samuel Silvestre);
- Tamoxifeno, Sigma Aldrich (Portugal);
- Flutamida, Sigma Aldrich (Portugal).

### III.2. Preparação das soluções dos compostos utilizados

#### III.2.1 - Diosgenina

A preparação da solução inicial de diosgenina consistiu na dissolução da mesma em 2ml de etanol absoluto, de modo a obter uma concentração final de  $10^{-2}$ M.

A partir da solução de  $10^{-2}$ M foram preparadas as concentrações requeridas para os vários trabalhos experimentais. As concentrações utilizadas foram 0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 10 $\mu$ M; 20 $\mu$ M; 30 $\mu$ M; 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M.

#### III.2.2 - 17- $\beta$ -estradiol

A preparação da solução inicial de 17- $\beta$ -estradiol consistiu na dissolução da forma pulverizada do mesmo em DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma Aldrich, Portugal), de modo a obter uma concentração final de  $10^{-2}$ M.

A partir desta solução inicial prepararam-se duas 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 foi preparada a concentração utilizada no trabalho experimental, sendo esta 10nM.

### III.2.3 - 7-Oxodiosgenina, diosgenona, 5,6-epoxidiosgenina

Para obter uma concentração de  $10^{-2}M$ , dissolveram-se os três compostos em etanol absoluto. A partir desta solução, prepararam-se as restantes soluções necessárias para o trabalho experimental. As concentrações utilizadas foram  $0,01\mu M$ ;  $0,1\mu M$ ;  $1\mu M$ ;  $10\mu M$ ;  $50\mu M$  e  $100\mu M$ .

### III.2.4 - Tamoxifeno e Flutamida

Prepararam-se soluções de  $10^{-2}M$ , dissolvendo os dois fármacos em etanol absoluto. A partir desta solução inicial, foram preparadas as concentrações requeridas no estudo, sendo estas  $0,1\mu M$ ;  $1\mu M$ ;  $10\mu M$ ;  $15\mu M$ ;  $20\mu M$ ;  $50\mu M$  e  $100\mu M$  nos ensaios com tamoxifeno e  $0,01\mu M$ ;  $0,1\mu M$ ;  $1\mu M$ ;  $10\mu M$ ;  $50\mu M$  e  $100\mu M$  nos ensaios com flutamida.

## III.3. Culturas celulares

Para realizar este estudo, foram utilizados três tipos distintos de células: fibroblastos da derme humana não cancerígenos (NHDF), células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7) e células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP).

### III.3.1 - NHDF

As células NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) são fibroblastos saudáveis derivados da derme humana. No estudo efectuado, estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Biochrom AG, Portugal), 20mM de *L*-glutamina (Sigma Aldrich, Portugal), 10mM de HEPES (Sigma Aldrich, Portugal), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich, Portugal) e 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25  $\mu g$ /ml de anfotericina B), a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de  $CO_2$ . O meio de cultura foi substituído a cada 2 a 3 dias e as células eram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. Nas experiências, as células foram utilizadas nas passagens 3 a 10.

### III.3.2 - MCF-7

As células MCF-7 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. MCF-7 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 estrogénios (Levenson A. S., et al, 1997). As células MCF-7 foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) e com 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B), a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2 a 3 dias e as células eram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. Nas experiências, as células foram utilizadas nas passagens 3 a 18.

### III.3.3 - LNCaP

As células LNCaP (*Lymph node carcinoma of the prostate*) são uma linha celular de células humanas do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios, isoladas em 1977, a partir de uma metástase de um nódulo linfático supraclavicular de um homem caucasiano com 50 anos. São células epiteliais aderentes que podem crescer sob a forma de agregados ou células isoladas. (Horoszewicz, J.S., et al, 1983) As células LNCaP foram mantidas em meio RPMI (Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) e com 1% de antibiótico (10,000 unidades/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina), a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 3 dias e as células eram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. Nas experiências, as células foram utilizadas nas passagens 3 a 10.

## III.4- Técnicas usadas nas culturas celulares *in vitro*

### III.4.1 - Congelamento e descongelamento de células

Quando armazenadas em bancos de células com azoto líquido (-180°C) e na presença de quantidades adequadas de DMSO (Sigma Aldrich, Portugal) (crioconservação), as linhas celulares podem sobreviver por um período de tempo superior a três anos (Saxena, K., et al, 1995).

As linhas celulares utilizadas no decorrer deste trabalho estavam armazenadas em bancos de células em azoto líquido. Para se proceder à sua utilização, descongelou-se, à temperatura ambiente, o conteúdo do tubo de crioconservação. De seguida, aqueceram-se cerca de 20 mL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) (RPMI para as células NHDF e LNCaP ou DMEM para as células MCF-7) e adicionou-se o conteúdo do tubo de crioconservação. Centrifugou-se (Centrifugadora Nuair<sup>TM</sup>, DHD Autoflow) a 1000 rpm durante 8 minutos. Descartou-se o sobrenadante, de forma a remover todo o DMSO (Sigma Aldrich, Portugal) e o *pellet* obtido foi ressuscitado no meio de cultura adequado. Por fim, colocou-se a ressuspensão celular num frasco de cultura, adicionou-se meio de cultura correspondente ao tipo de linha celular (cerca de 15mL para um frasco de 75mL) e incubou-se a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao longo deste trabalho laboratorial, células provenientes de culturas próximas da confluência de diferentes passagens foram congeladas e armazenadas. Para tal, efectuou-se o processo de tripsinização das culturas celulares nessas condições. Depois de uma etapa de centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* resultante foi ressuscitado em meio de cultura completo e com 10% de DMSO. A suspensão final foi dividida por tubos de crioconservação (1mL por cada tubo), que foram colocados a -20°C durante 4 horas, depois mantidos a -80°C por 1 a 3 dias e finalmente armazenados em azoto líquido a -180°C.

### III.4.2 - Tripsinização

Ao longo do tempo, as culturas de células foram ficando confluentes nos frascos. A avaliação da confluência das células foi efectuada através de observação microscópica (Olympus CK 40). Após atingirem 70 a 80% de confluência, as células foram expandidas para mais frascos de cultura. Para tal foi realizado o procedimento da tripsinização. Este procedimento consistiu na aspiração com vácuo do meio de cultura existente no interior do frasco. De seguida, fez-se lavagem das células com tampão fosfato salino (PBS) (cerca de 10mL para um frasco de 75mL) e colocaram-se cerca de 10mL (no caso de um frasco de 75mL) de tripsina (0,025% em PBS/EDTA - Sigma Aldrich, Portugal); em contacto com as células. Colocou-se o

frasco de cultura na estufa (Bioblock Scientific - Sigma Aldrich, Portugal) durante 5 minutos a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, para que as células existentes no suporte sólido (base do frasco de cultura) se soltem e se dissociem entre si. Após confirmação microscópica de que as células se encontravam em suspensão, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura suplementado com FBS previamente aquecido a 37°C e a suspensão celular resultante foi centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos. Seguidamente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com meio de cultura. A suspensão celular resultante foi colocada em novos frascos de cultura.

### III.4.3 - Contagem de células

Para iniciar um novo ensaio celular foi necessário contabilizar o número de células a colocar nos pocetos. Para tal, após tripsinização das culturas celulares, o *pellet* resultante foi ressuspendido em 1ml de meio de cultura completo. Seguidamente, retiraram-se 10µl da suspensão celular para o interior de um tubo *ependorf* e ao mesmo adicionaram-se 10µl de solução de azul de triptano 0,4% (Merck, Alemanha). O conteúdo resultante foi aplicado numa câmara de *Neubauer* e contabilizou-se o número de células existente por quadrante. Para calcular o volume a retirar da suspensão celular, calculou-se a média de células existente por quadrante e multiplicou-se o valor obtido por 2 (devido à diluição das células no corante azul de triptano).

Com o valor resultante calculou-se a quantidade a retirar da suspensão celular inicial para obter a concentração de células pretendida nos pocetos.

### III.5 - Procedimento geral realizado para estudar o efeito dos compostos estudados na viabilidade celular

Para cada ensaio celular, foram preparadas placas *multiwells* de 24 ou 48 pocetos, com uma concentração de  $2 \times 10^4$  células/mL, sendo mantidas em meio de cultura adequado por aproximadamente 48 horas.

Passado o período de tempo pretendido, adicionaram-se os compostos em estudo nas concentrações requeridas. Os compostos permaneceram em contacto com as células durante 24, 48 ou 96 horas, dependendo da análise a efectuar. Em todas as experiências realizadas, a

concentração final de solvente nos pocetos foi sempre inferior a 1%; esta concentração de solventes não teve efeito na viabilidade celular.

Passado o período de exposição das células aos compostos, as placas cujas células não sofreram o processo de recuperação foram imediatamente sujeitas ao ensaio de viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - Sigma Aldrich, Portugal) e nos ensaios com recuperação, foi adicionado meio de cultura suplementado com FBS apropriado a cada tipo de células, ficando em incubação 48h. Passado este tempo de incubação, as placas com as células foram também sujeitas ao mesmo teste de viabilidade celular.

Para todas as concentrações dos compostos de interesse testadas, foram realizados ensaios em triplicado de modo a efectuar uma análise estatística. Por outro lado, em cada placa *multiwell* foi testado um controlo. Este consistiu em aplicar apenas meio de cultura sem adicionar qualquer composto de interesse. A média dos valores de absorvância obtida nos três pocetos do ensaio controlo foi considerada como 100% de viabilidade celular. Todos os restantes valores adquiridos após a incubação com os compostos de interesse foram considerados em relação ao ensaio controlo, de forma a uniformizar os resultados obtidos e comparar as viabilidades celulares na ausência dos compostos testados com a presença dos mesmos.

Adicionalmente, foram realizados ensaios de citotoxicidade em que foi utilizado meio de cultura com FBS-Charcoal em vez do FBS comum. Este meio foi preparado com base no procedimento descrito por Cepa, M., et al. (2008) e consistiu em remover os esteróides presentes no FBS convencional. Para tal, incubaram-se 500mL de FBS inactivado por calor com 8g de charcoal activado, durante 24h à temperatura ambiente. Seguidamente, centrifugou-se durante 15 minutos a 4000g de forma a separar o charcoal do soro. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,22µm por poro. Após exposição das células ao composto de interesse, o meio que estava nos pocetos foi aspirado e substituído por meio FBS-charcoal durante 48h.

## **III.6 - Ensaio realizado para analisar a viabilidade celular**

### **III.6.1- Ensaio de toxicidade (MTT)**

O ensaio de toxicidade depende do número de células presentes, bem como da actividade mitocondrial celular e baseia-se na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, Portugal) a cristais de formazano (composto azul, insolúvel em meio aquoso) 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. Este ensaio permite ainda medir os efeitos citotóxicos e de sensibilidade a determinados fármacos quer em linhas de culturas celulares quer em culturas primárias de células. (van Meerloo, et al., 2011).

Após as linhas celulares terem estado em contacto com os diferentes compostos durante o período de tempo do ensaio, os sobrenadantes foram aspirados e aplicou-se uma solução de MTT (com uma concentração de 0,5 mg/mL em tampão fosfato salino - PBS) em contacto com as células, durante 4 horas, numa atmosfera de 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e na ausência 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, DMSO e tampão glicina Sorensen (solução de 0,1M L-glicina e 0,1M NaCl, com o pH ajustado a 10,5 com 0,1M de NaOH). O DMSO permitiu a lise celular e solubilização dos cristais de formazano 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 (BiochromAnthos 2020) e foi quantificada a absorvância a 570 nm. A extensão de morte celular foi expressa como percentagem de viabilidade celular em comparação com as células controlo.

### III.7 - Análise estatística

Para comparar os resultados obtidos, recorreu-se a uma análise estatística. Os resultados gráficos de citotoxicidade foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre múltiplos grupos foi analisada pelo teste *t-student* para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. A diferença entre grupos foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir da curva dose-resposta por cálculos de ajustamento sigmóide.

### III.8 - Procedimento geral realizado para estudar o efeito dos compostos diosgenina, 7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina na proliferação de fungos

O método utilizado para avaliar a acção antiproliferativa dos compostos estudados foi a técnica de difusão em disco de acordo com as normas da CLSI M44-A (CLSI, 2003). As estirpes fúngicas utilizadas foram *Candida albicans* ATCC 90028 e três estirpes clínicas: *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida lusitanae*.

Segundo as normas da CLSI foi utilizado o meio de cultura Mueller-Hinton agar suplementado com 2% de glicose (Sigma-Aldrich, Portugal) e 0,5 µg/ml de azul de metileno (Merck, Alemanha). O meio Mueller-Hinton foi preparado conforme instruções do fabricante e é o recomendado, uma vez que apresenta boa reprodutibilidade, a glicose nele presente promove o crescimento da maioria das leveduras e a adição de azul de metileno permite uma melhor definição das zonas de inibição. O pH do meio foi ajustado entre 7,2 e 7,4 à temperatura ambiente. Foi também utilizado o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA - Liofilchem, Itália) preparado de acordo com as instruções do fabricante. Este meio foi utilizado para efectuar as sementeiras das várias estirpes em estudo.

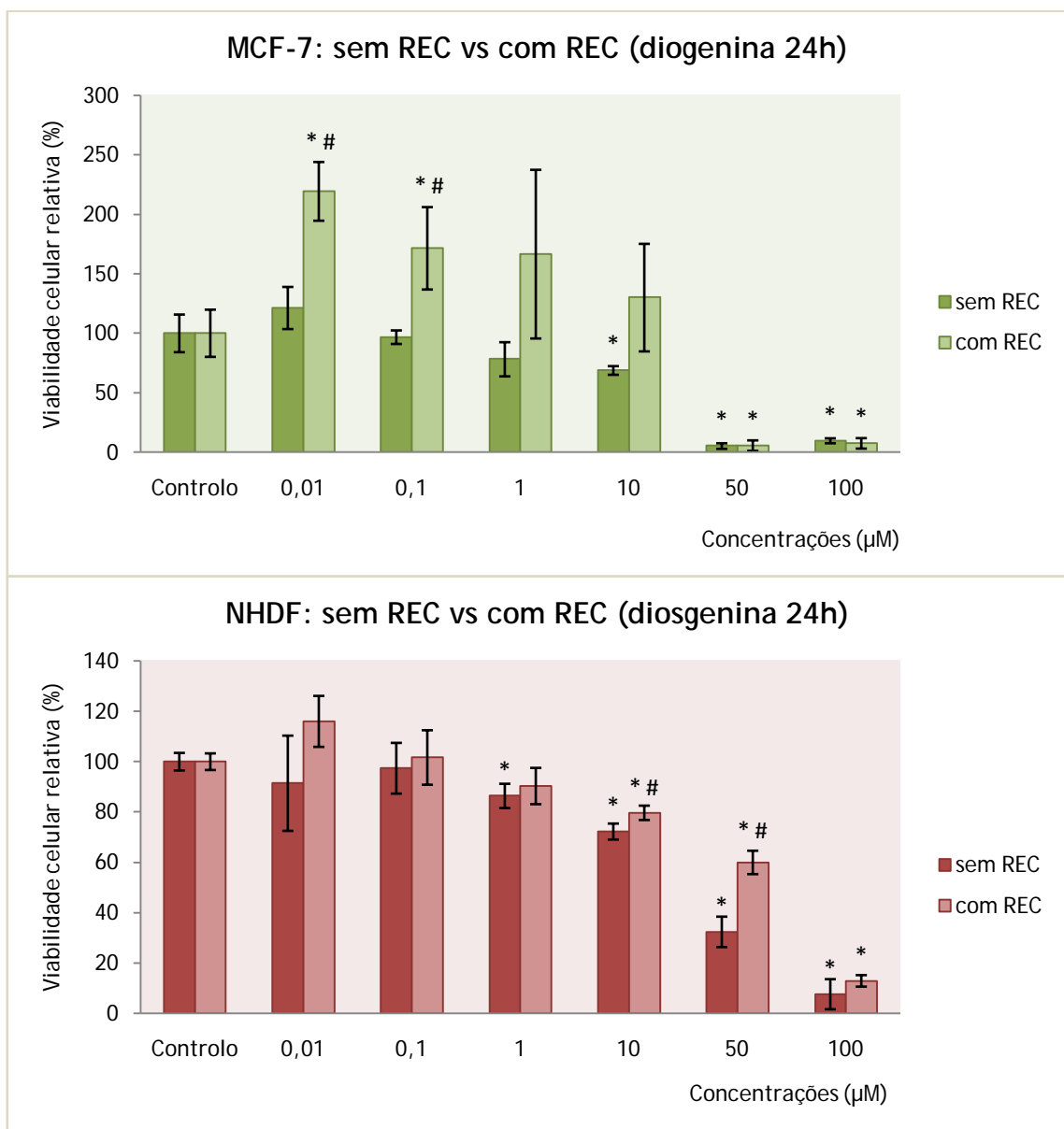
Com o auxílio de uma ansa esterilizada, retiraram-se colónias de leveduras de cada estirpe que foram colocadas em 10ml de solução salina, a fim de obter uma turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland. De seguida, inocularam-se as placas de Mueller-Hinton com esta solução. Esta inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do agar em três direcções, girando a placa num ângulo de 60° após cada estria. Antes da aplicação dos discos (Whatman, Reino Unido), aguardou-se algum tempo para que o excesso da humidade da superfície do agar fosse absorvido. A aplicação dos discos foi feita com o auxílio de uma pinça esterilizada para evitar contaminações. Os discos ficaram distanciados um dos outros e da margem da placa, de modo a impedir a sobreposição de halos de inibição.

Os compostos utilizados foram dissolvidos em DMSO, de forma a obter as seguintes concentrações: 0,2mg/ml, 1mg/ml e 5mg/ml; o volume de solução aplicado em cada disco foi de 20µl. Foram também utilizados discos impregnados com DMSO (20µl) para controlo negativo e como controlo positivo foi utilizada anfotericina B (7,8µl) com uma concentração de 3,2µg/ml.

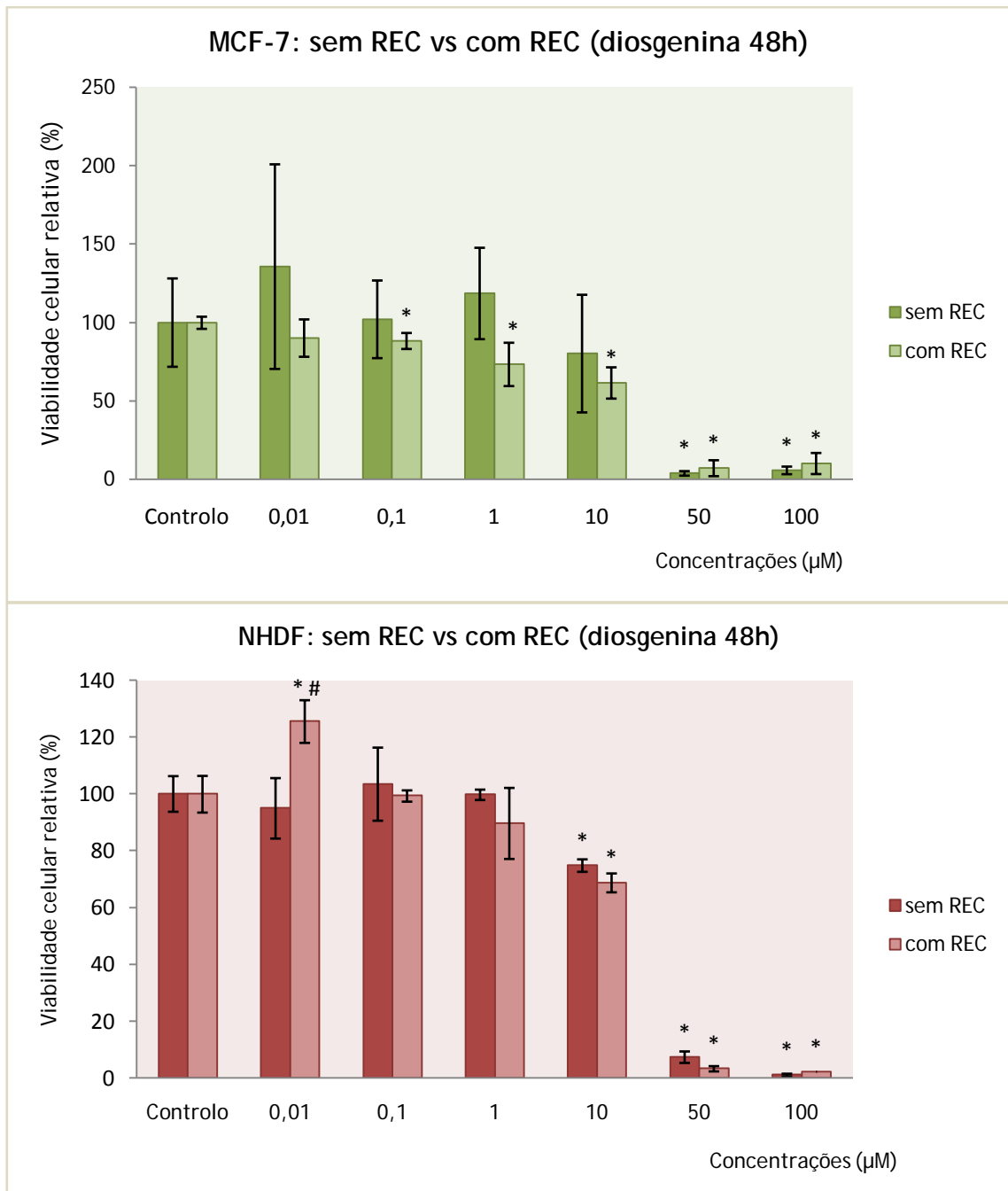
Após 24 a 48 horas de incubação, observaram-se as placas para verificar se o crescimento obtido era uniforme, se existia presença de contaminações e se o diâmetro do halo de inibição estava bem definido. Após esta visualização, a leitura dos halos foi realizada com o auxílio de uma régua.

## IV - Resultados e Discussão

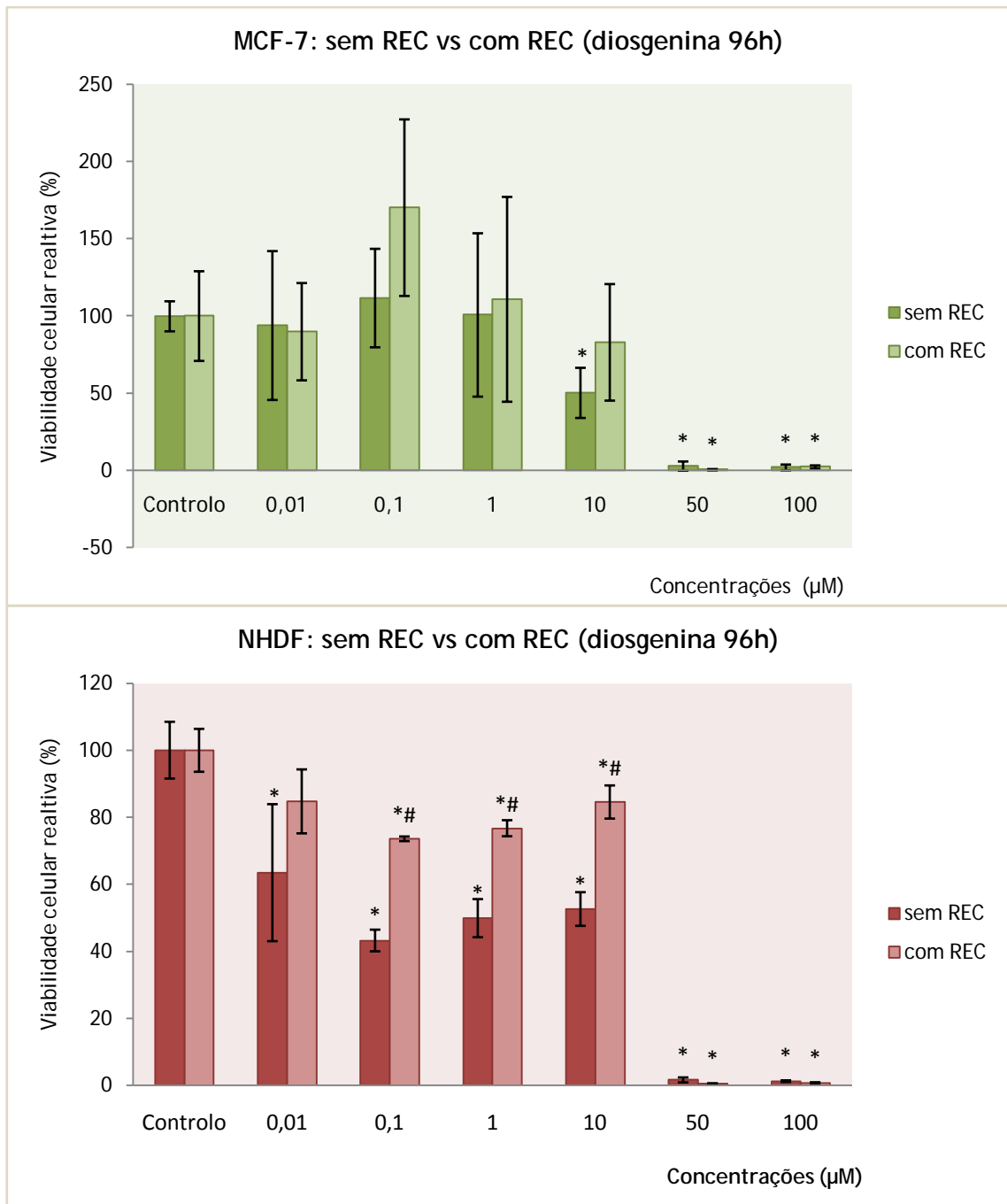
Inicialmente e no sentido de avaliar o efeito do composto diosgenina na proliferação/viabilidade celular das células NHDF e MCF-7, realizou-se o ensaio MTT. Com o objectivo de estabelecer as condições do estudo, efectuaram-se diferentes ensaios em que as células acima descritas foram colocadas em contacto com a diosgenina durante 24, 48 e 96 horas. As concentrações utilizadas foram 0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 10 $\mu$ M; 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M. Além disso, foram efectuados ensaios com e sem recuperação das células com meio de cultura suplementado com FBS. Os resultados destas experiências estão representados nas figuras 11 a 16, para as células MCF-7 e NHDF.



Figuras 11 e 12: Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M durante 24h, com e sem recuperação com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo; # $p < 0,05$  comparando as duas experiências com a mesma concentração (teste *t*-student).



**Figuras 13 e 14:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 48h, com e sem recuperação com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*p<0,05 *versus* respectivo controlo; #p<0,05 *versus* comparando as duas experiências com a mesma concentração (teste *t*-student).



**Figuras 15 e 16:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 96h, com e sem recuperação com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*p<0,05 versus respectivo controlo; #p<0,05 versus comparando as duas experiências com a mesma concentração (teste t-student).

Analisando os resultados obtidos relativamente à experiência de 24h, constata-se que nas células MCF-7, após a recuperação, há um aumento da proliferação celular em relação ao controlo nas concentrações 0,01 e 0,1 µM. Nas concentrações 1 e 10µM verifica-se tendência similar, embora não haja diferença estatisticamente significativa. Nas concentrações 50 e 100 µM não há qualquer recuperação detectável. Estes dados sugerem que possa haver uma ocupação, possivelmente parcial dos receptores estrogénicos pela diosgenina, que compete

com o E<sub>2</sub> (presente no FBS). A diosgenina, caso apresente efeito estrogénico, conforme o que a literatura menciona, este será certamente inferior ao do E<sub>2</sub>. No ensaio de recuperação, após a diosgenina ser retirada, como as células terão desenvolvido uma “avidez” para E<sub>2</sub>, ocorre então o observado aumento de proliferação, estimulado por este. Nas concentrações mais elevadas de diosgenina, poderão estar a ocorrer outros efeitos além deste, pelo que a resposta já poderá ser diferente. O mesmo não se verifica para as células NHDF em condições similares. Apenas a 50µM se observa um aumento significativo da recuperação em comparação com a mesma experiência sem recuperação, embora em ambos os casos a proliferação seja inferior à dos respectivos controlos, ao contrário do observado para as concentrações 0,01 e 0,1 µM nas células MCF-7.

Quando realizada a mesma experiência durante 48h, nas células MCF-7 observa-se uma situação diferente da que se observou na experiência de 24h. Aqui, no ensaio de recuperação verifica-se que há uma tendência para diminuição da proliferação celular em comparação com a mesma experiência sem recuperação nas concentrações mais baixas de diosgenina. Nas concentrações de 50 e 100µM não há efeitos significativos. Nas células NHDF observa-se uma situação similar à observada na experiência de 24h. Contudo, na concentração 0,01µM, verifica-se um aumento da proliferação celular em relação ao controlo, tendência que também já se observava na experiência de 24h, embora aqui não exista diferença estatisticamente significativa. Além disto, verifica-se que a 50µM há menor proliferação celular na experiência de 48h que na de 24h. Na parte I do anexo desta dissertação encontram-se tabelados os valores de IC<sub>50</sub> das várias experiências com 48h de exposição a compostos realizadas neste trabalho. Na parte II do referido anexo pode observar-se as células MCF-7 após exposição a 30µM de diosgenina durante 48h *versus* controlo, em que não se verificam alterações significativas detectáveis ao microscópio com ampliação de 100X.

Na experiência de exposição à diosgenina durante 96h, no caso das células MCF-7, verifica-se que há proliferação até 10µM e que há morte celular nas duas concentrações mais elevadas. Contudo, não parecem existir diferenças entre a experiência com e sem recuperação. É de destacar a variabilidade dos resultados obtidos, o que se reflectiu nos desvios padrões observados. Na experiência com as células NHDF, observou-se um resultado similar ao verificado nas células MCF-7 quando expostas durante 24h à diosgenina, no que respeita à recuperação. Difere apenas o facto de isso se sentir nas concentrações 0,1, 1 e 10µM nas células NHDF (96h) e nas concentrações 0,01, 0,1 e 1µM para as MCF-7 (24h), o que poderá ser explicado pelo facto de as células MCF-7 serem mais sensíveis aos estrogénios do que as NHDF.

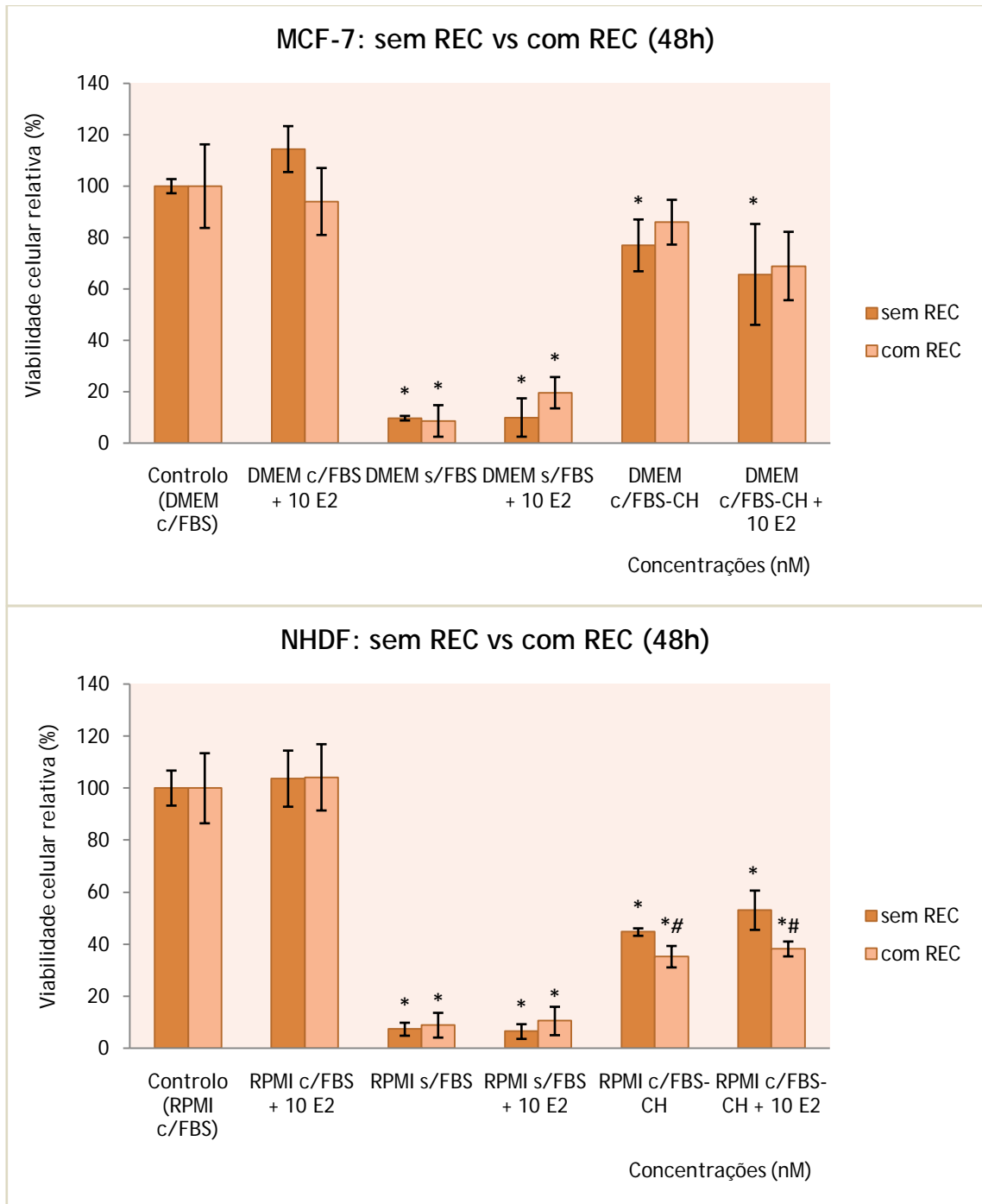
Um dos nossos objectivos com este estudo era seleccionar uma “experiência padrão”, incluindo um tempo de exposição aos compostos em análise, para efectuar outros estudos neste contexto, incluindo avaliação de compostos derivados da diosgenina. Assim, atendendo a estes dados, decidimos seleccionar 48 horas de exposição, por nos parecerem os resultados mais reprodutíveis e em que os potenciais efeitos estrogénicos da diosgenina não pareceram

tão evidentes como na experiência de 96h e de 24h. Outra razão para a escolha do tempo de exposição de 48h prende-se com o facto de que o ciclo celular destas células é superior a 24, mas inferior a 48h, pelo que se poderá avaliar o efeito de compostos num ciclo celular completo. Adicionalmente, é de ser ter ainda em conta o facto se poderem ocorrer transformações metabólicas e efeitos genómicos nas células - nestes casos, um tempo de exposição curto também não é favorável à obtenção de informação e portanto 24h parece-nos pouco tempo.

Este estudo revelou dados interessantes que se podem tentar explicar pela já equacionada potencial acção estrogénica da diosgenina mamário (Chen, J.H., et al, 2008; Aradhana, R., et al, 1992; Scott, A., et al., 2000; Joseph L., 1999), que, porém, ainda não foi inequivocamente demonstrada. Assim, para tentarmos explorar esta área, decidiu-se efectuar experiências nestas células similares às anteriores, mas usando meio de cultura sem FBS, e portanto, sem estrogénios. Os resultados obtidos revelaram-se, contudo, inconclusivos. Nas experiências com as células MCF-7 estas morriam, provavelmente por falta de compostos estimulantes do crescimento celular existentes no FBS. Verificou-se, contudo, em mais que uma experiência, que em concentrações baixas de diosgenina sobreviviam algumas células, facto que nos continuou a chamar à atenção aos potenciais efeitos estrogénicos da diosgenina. No caso das células NHDF verificou-se que as células não morriam, mas não se detectava qualquer efeito significativo no seu crescimento celular em comparação com o controlo.

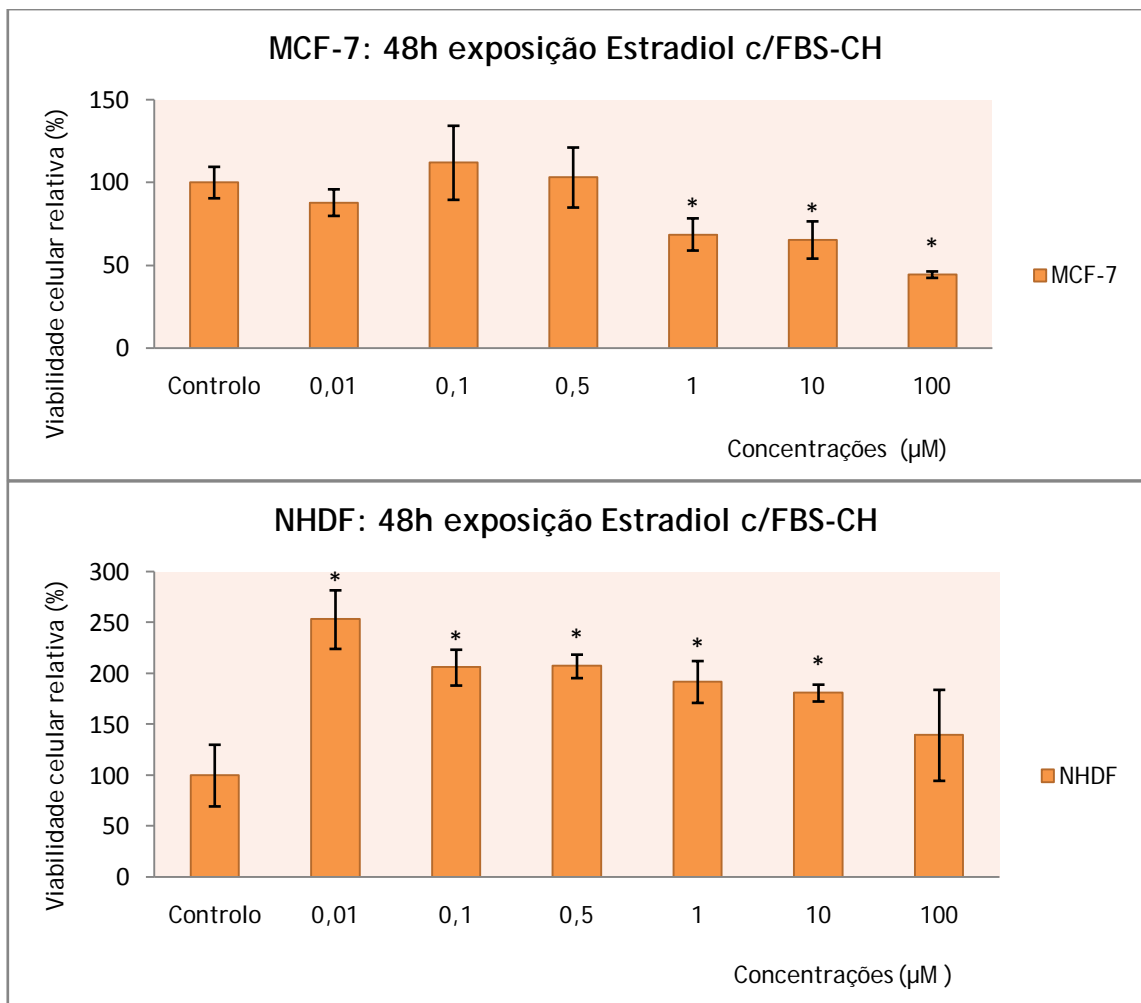
Estes dados levaram-nos a equacionar a utilização de um FBS sem esteróides, incluindo  $E_2$ , mas que contivesse ainda outros elementos estimulantes do crescimento de células. Assim, optou-se por utilizar o método descrito por Cepa, M., et al (2008), em que se fez a extracção dos esteróides com charcoal activado, de acordo com o método descrito na parte experimental desta dissertação. Além disto, usou-se 5% de FBS-charcoal no meio de cultura em vez dos habituais 10% com FBS inalterado. No sentido de se tentar verificar se a metodologia acima referida, envolvendo a utilização de 5% de FBS-charcoal, poderia ser útil para tentar avaliar a hipotética estrogénica, foram efectuados estudos comparando a utilização de meio completo com FBS, meio com 5% de FBS-charcoal e meio sem FBS na presença ou ausência de 10nM de  $E_2$  e com e sem recuperação durante 48h. A selecção da concentração de 10nM de  $E_2$  foi efectuada com base em experiências anteriores com estas células, que indicavam ser esta uma concentração que poderia mimetizar as concentrações plasmáticas pós-menopáusicas desta hormona, e que já estavam a ser utilizadas em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de investigação no qual este projecto se insere. Os resultados, apresentados nas figuras 17 e 18, mostram que, em ambos os tipos de células, utilizando FBS-charcoal, há viabilidade celular superior à das experiências em condições similares, mas sem FBS, embora inferior à observada na presença de 10% de FBS, o que se explica facilmente pela depleção parcial de estimulantes de crescimento celular no FBS-charcoal. Verifica-se, também, contudo, que a presença de  $E_2$  teve um efeito estimulante da proliferação celular inferior ao esperado - este efeito apenas foi mais evidente na experiência

com FBS nas células MCF-7 e na experiência com FBS-charcoal nas células NHDF, nos ensaios sem recuperação. Quanto aos dados, quando se estuda a recuperação, verifica-se que não há qualquer diferença aparente entre as experiências com e sem recuperação. Esta observação não é, naturalmente, completamente concordante com a hipótese acima questionada de que a diosgenina deverá competir para os ER mas que tem acção estrogénica inferior à do E<sub>2</sub>.



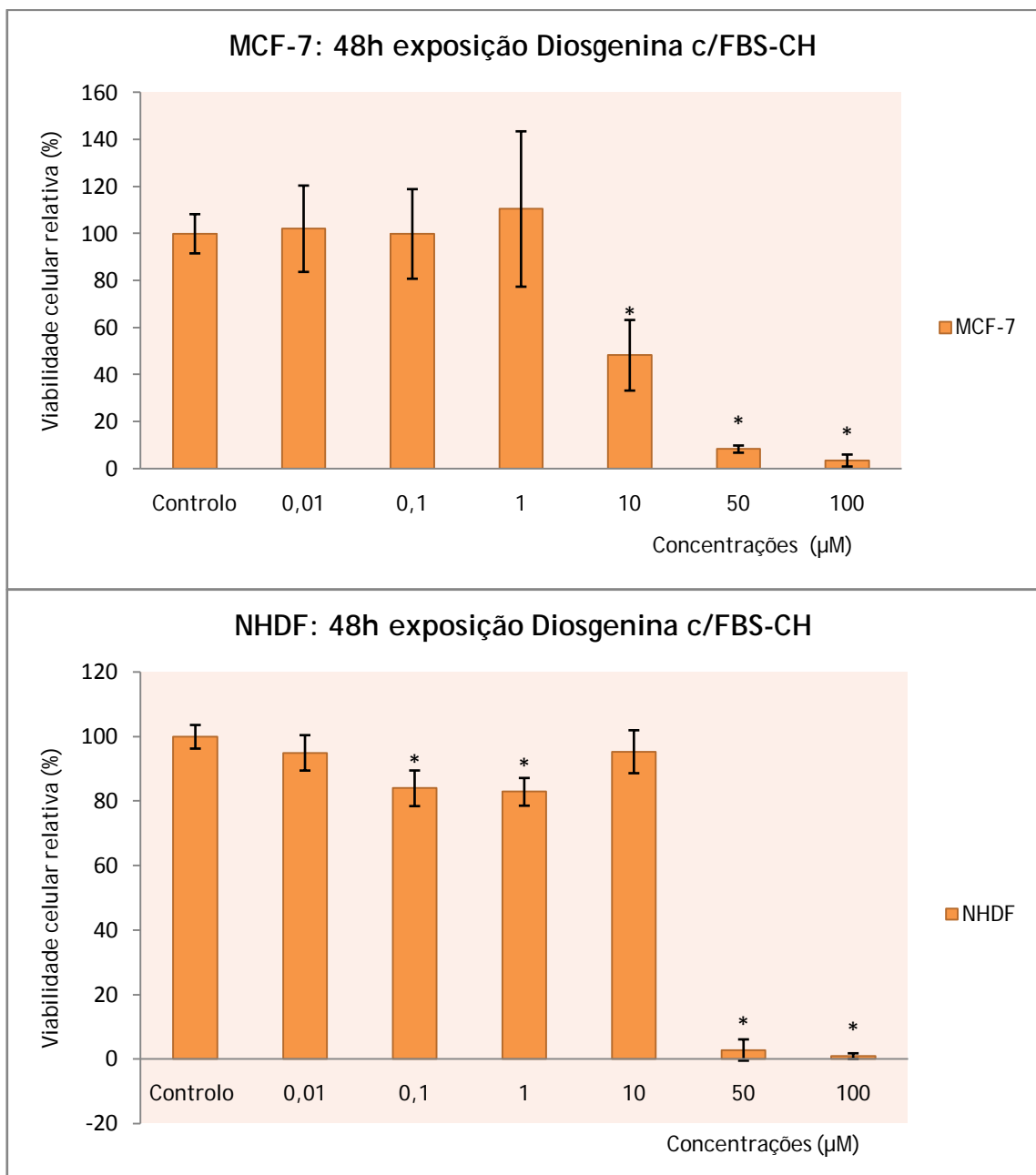
**Figuras 17 e 18:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com estradiol (10nM) durante 48h, com e sem recuperação com meios de culturas c/FBS, s/FBS e FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*p<0,05 versus respectivo controlo; #p<0,05 versus comparando as duas experiências com a mesma concentração (teste t-student).

Estes dados levaram-nos também ao estudo do efeito de várias concentrações crescentes de  $E_2$  na presença de 5% de FBS-charcoal, em ambos os tipos de células e durante 48h, que são apresentados nas figuras 19 e 20. Estes dados mostraram, nas células MCF-7, que o  $E_2$  em nenhuma das concentrações estudadas estimulou significativamente a proliferação das células. Adicionalmente, observou-se que em concentrações iguais ou superiores a  $1\mu\text{M}$  teve uma acção antiproliferativa. Os resultados aqui verificados não vão ao encontro do expectável, que seria uma acção proliferativa do  $E_2$  em baixas concentrações nestas células. Uma hipótese a considerar é que será necessário aumentar o tempo de exposição ao  $E_2$  para que se possa observar a acção proliferativa esperada, uma vez que as células MCF-7 são hormono-dependentes. Nas células NHDF observou-se, ao contrário das MCF-7, que em todas as concentrações, excepto  $100\mu\text{M}$ , ocorreu um estímulo do crescimento celular em comparação com o controlo. Este resultado é parcialmente concordante com o observado na experiência acima descrita, embora aí a diferença entre o resultado do controlo e do meio FBS-charcoal com  $10\text{nM}$  de  $E_2$  seja menos marcada.



Figuras 19 e 20: Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com estradiol em concentrações entre  $0,01$  e  $100\mu\text{M}$ , durante 48h, com meio de cultura com FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste  $t$ -student).

Adicionalmente, realizaram-se estudos similares a este, mas na presença de diosgenina (figuras 21 e 22), os quais mostram, se considerarmos que este modelo poderá indiciar efeitos estrogénicos, que a diosgenina, nestas condições não tem efeitos proliferativos nestas células. É de destacar que, nas células MCF-7 se verifica maior toxicidade que nas NHDF, pois a 10 $\mu$ M nas células MCF-7 já só há cerca de 50% da viabilidade, o que não se observa para as células NHDF. Nas concentrações de 50 e 100 $\mu$ M há forte destruição celular em ambos os tipos de células. Esta diferença de toxicidade nas células MCF-7 e NHDF é reafirmada pelos valores por nós calculados de IC<sub>50</sub> em que para as células MCF-7 é de 11,40 $\mu$ M e para as células NHDF é de 71,13 $\mu$ M.

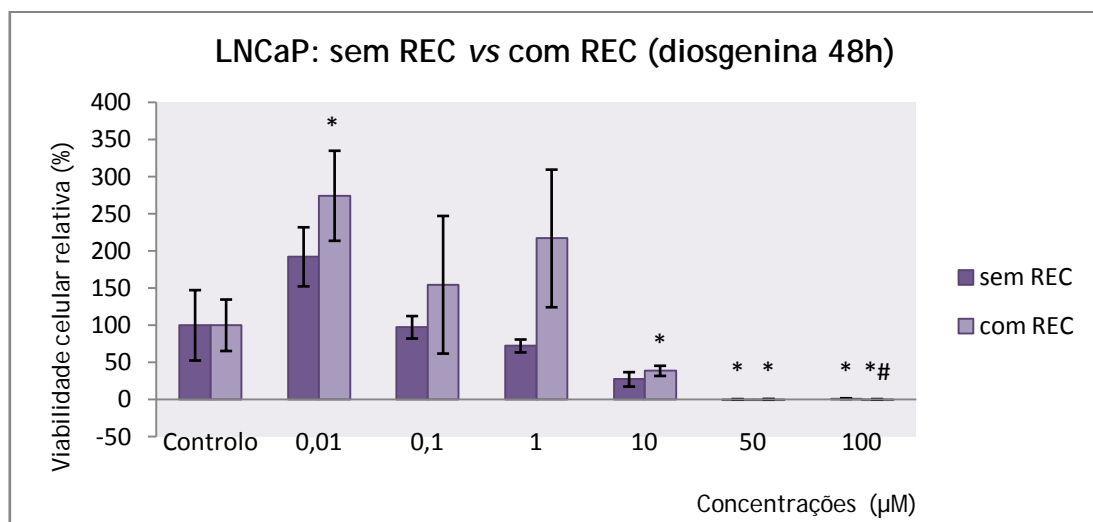


**Figuras 21 e 22:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01 e 100  $\mu$ M, durante 48h, com meio de cultura com FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

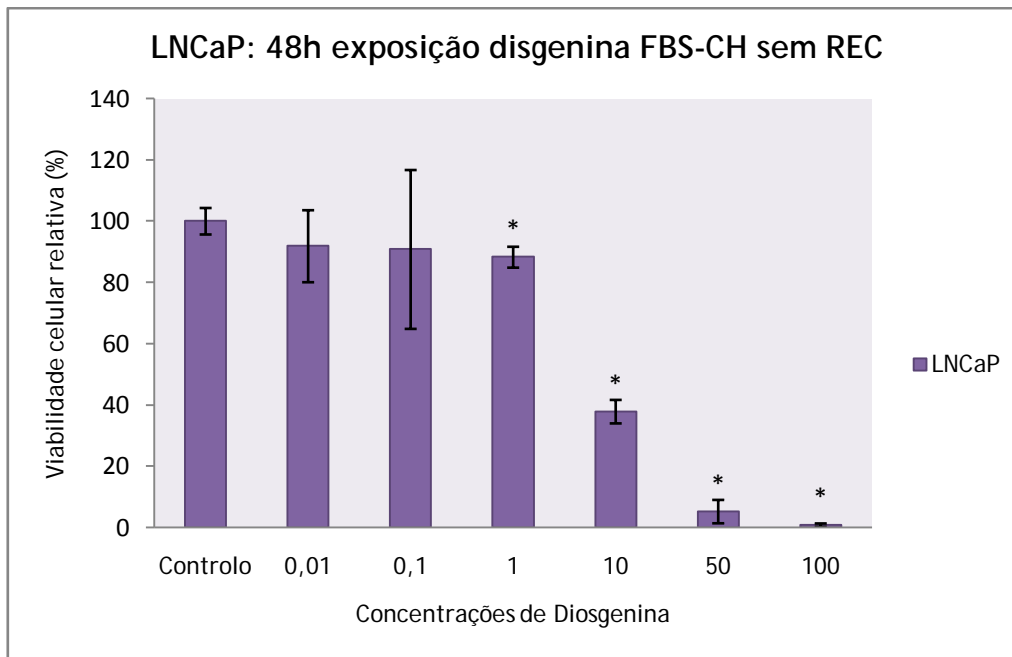
Naturalmente, no que respeita ao estudo da potencial estrogénica da diosgenina e sua consequência na proliferação celular, este estudo revelou limitações, como se pode verificar. Assim, de acordo com os dados das experiências iniciais (24, 48 e 96h de exposição à diosgenina, na presença de meio completo, com FBS), poderia equacionar-se a possibilidade de estudar de forma mais aprofundada a exposição à diosgenina durante 24h pelas células MCF-7 e durante 96h pelas NHDF. Adicionalmente e de acordo com outros autores (Schmitt, M., 2001; Bocuzzi, G., et al, 1992; Ouellet, É., et al, 2011), é de considerar o estudo durante tempos prolongados (3 e 6 dias) na presença ou na ausência de E<sub>2</sub>. Adicionalmente os estudos foram efectuados com meios de cultura contendo vermelho de fenol, que tem uma acção estrogénica fraca (Cepa, M., et al, 2008), pelo que em estudos para aprofundar estes resultados isto também tem de se ter em conta.

Foram ainda realizadas várias experiências de citometria de fluxo, que não descrevemos na parte experimental do trabalho, no sentido de tentar explorar os efeitos citotóxicos da diosgenina nas células MCF-7. As experiências realizadas incluíram a avaliação do efeito no ciclo celular com iodeto de propídio, a existência de morte celular por necrose/apoptose usando anexina V - FITC e iodeto de propídio e detecção e quantificação de bcl-2 e p53. Contudo, não foi possível otimizar as técnicas, pois não se detectou a existência de apoptose nas nossas condições experimentais, o que contrariava os resultados existentes na literatura (Srinivasan, S., et al, 2009; Corbiere, C., et al, 2004), e por este motivo não apresentamos os resultados. Pretendemos futuramente explorar este ponto.

De acordo com os objectivos propostos e com o intuito de poder avaliar o efeito da diosgenina noutro tipo de células, foram efectuados ensaios com células LNCaP. Estes ensaios foram realizados utilizando meio com 10% FBS, com e sem recuperação e durante 48h. Os resultados obtidos estão representados na figura 23.



**Figura 23:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 48h, com e sem recuperação com meio de cultura c/FBS e c/FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*p<0,05 versus respectivo controlo; #p<0,05 versus comparando as duas experiências com a mesma concentração (teste t-student).

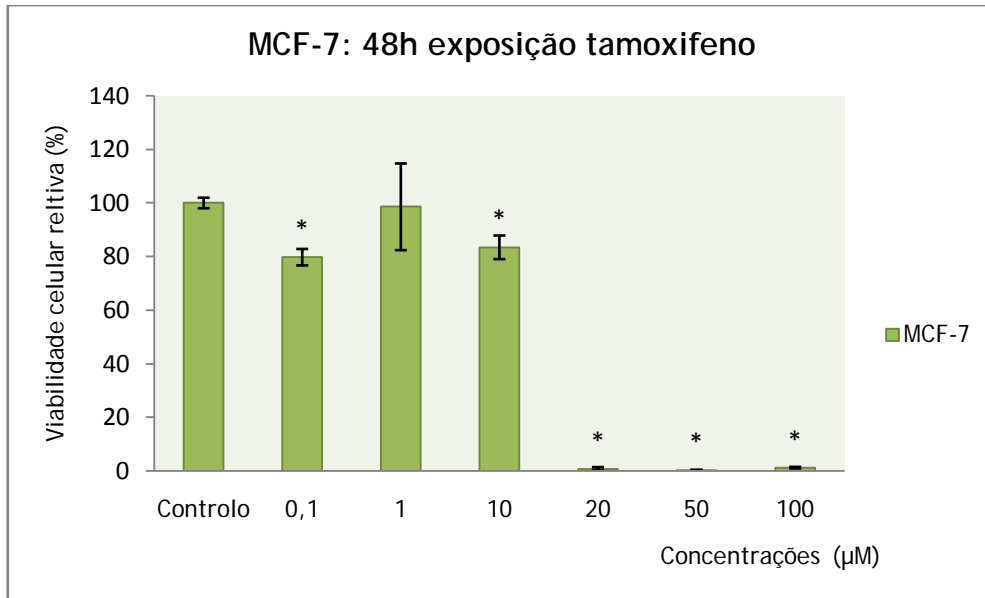


**Figura 24:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com diosgenina em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 48h, com meio de cultura com FBS-CH, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (*t*-student).

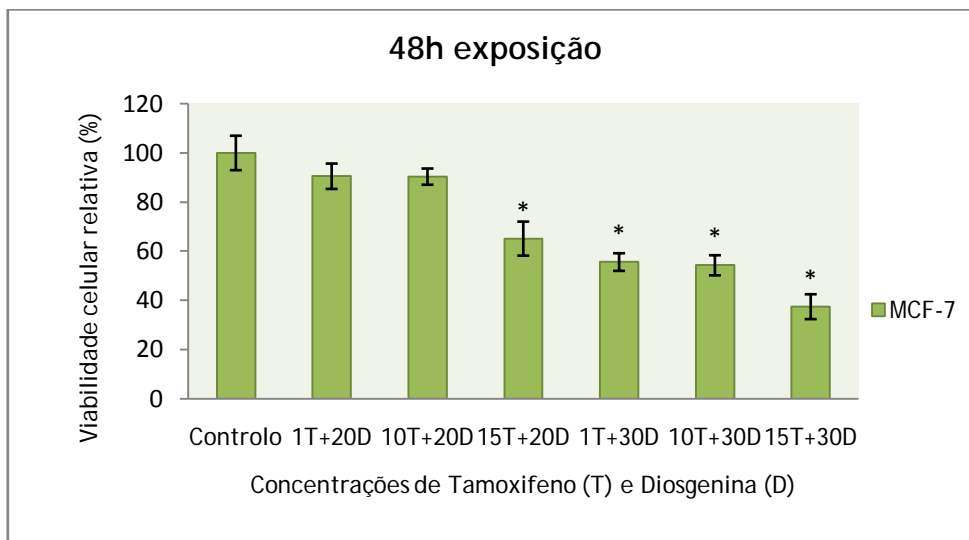
Analisando estes resultados, constata-se que, nas duas experiências, após a recuperação, há um aumento significativo da proliferação celular em relação ao controlo na concentração 0,01µM. Na concentração 10µM verifica-se um decréscimo da proliferação celular em relação ao controlo e nas concentrações 50 e 100 µM não há qualquer recuperação detectável. No ensaio com FBS-charcoal, sem recuperação, não existem diferenças estatisticamente significativas de proliferação celular, a concentrações baixas de diosgenina (figura 24).

Outro dos nossos objectivos consistiu em avaliar o efeito da diosgenina em combinação com outros fármacos anticancerígenos clássicos, como é o caso do tamoxifeno, em células do cancro da mama, e da flutamida, em células do cancro da próstata. Para tal, avaliou-se inicialmente o efeito do tamoxifeno nas células MCF-7, expostas a este composto durante 48h (figura 25). Observando a figura, verifica-se que a concentrações elevadas de tamoxifeno (20, 50 e 100µM) há morte celular, enquanto que nas concentrações mais baixas há diminuição da viabilidade celular, excepto a 1µM. Posteriormente, avaliaram-se os efeitos que a combinação de tamoxifeno e diosgenina poderia ter nas células MCF-7 (figura 26). De acordo com o IC50 (calculado anteriormente) da diosgenina neste tipo de células, foram escolhidas as concentrações 20 e 30µM. As concentrações de tamoxifeno utilizadas foram escolhidas com base na experiência anterior. Constata-se, através da leitura do gráfico, que existe uma diminuição da proliferação celular para as concentrações mais elevadas dos dois compostos (15µM de tamoxifeno e 30µM de diosgenina). Contudo, não se observam diferenças de

proliferação entre as concentrações 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de tamoxifeno, quando combinado com 20 $\mu$ M de diosgenina. Estes resultados parecem contrariar o que se esperava, que seria morte celular muito elevada, sobretudo na combinação 15 $\mu$ M de tamoxifeno com 30 $\mu$ M de diosgenina pelo que se pode considerar que parece haver um efeito protector da destruição celular nestas condições. Assim, apesar destes resultados implicarem mais estudos, podemos concluir que esta combinação não deve ser equacionada no tratamento do cancro da mama.

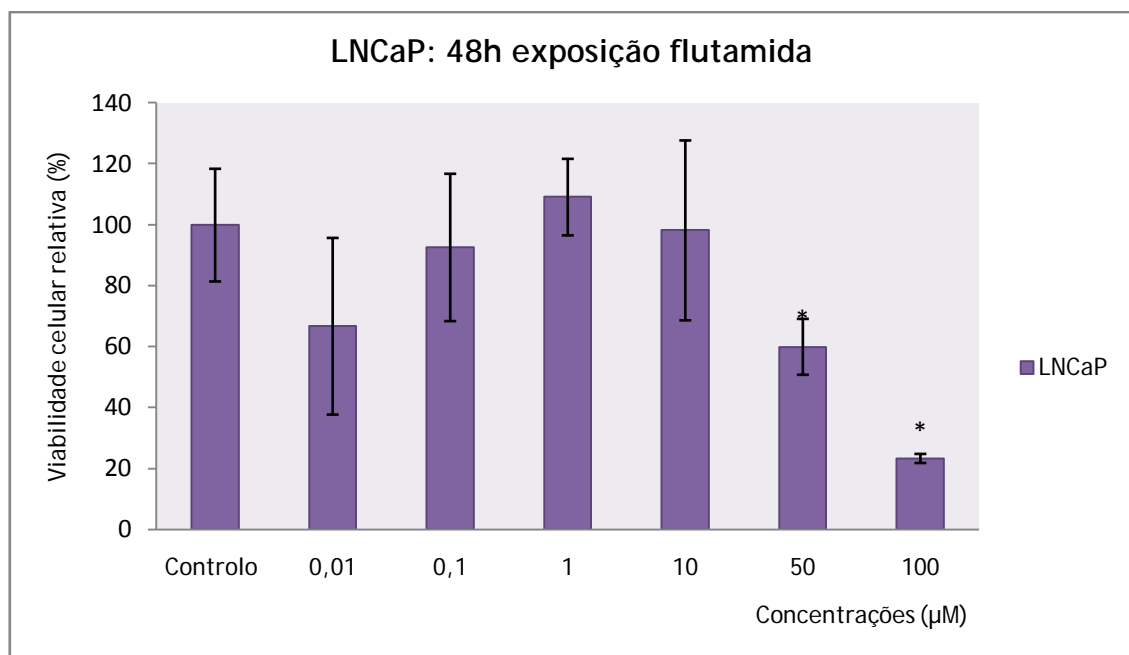


**Figura 25:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, incubadas com tamoxifeno em concentrações entre 0,1 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, durante 48h, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

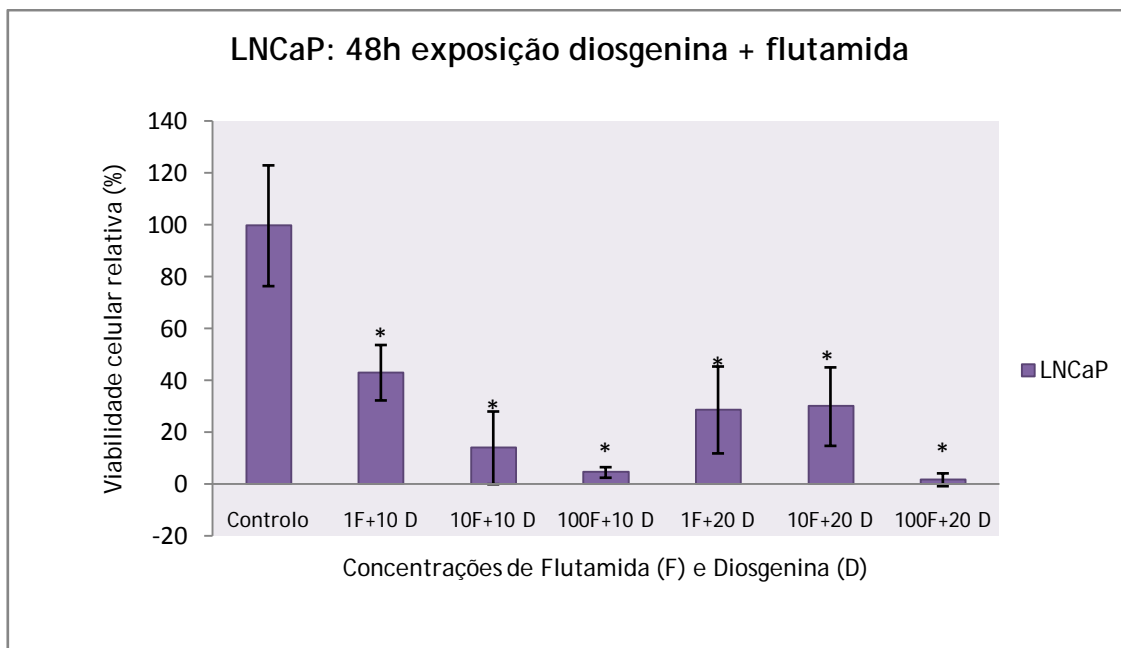


**Figura 26:** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, incubadas com tamoxifeno (T) e diosgenina (D) em concentrações entre 0,1 $\mu$ M e 100 $\mu$ M e 20 $\mu$ M e 30 $\mu$ M, respectivamente, durante 48h, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

Relativamente ao estudo com flutamida e diosgenina nas células LNCaP (androgénio-dependentes) foram realizados ensaios em condições similares às da experiência anterior mas foram utilizadas concentrações diferentes de flutamida, como se pode visualizar na figura 27. As células LNCaP estiveram expostas à flutamida durante 48h em meio com FBS, de acordo com a metodologia seguida por alguns autores (Colabufo, N. A. et al, 2008). Neste caso, verifica-se que existem diferenças significativas na viabilidade celular apenas nas concentrações de 50 e 100 $\mu$ M. Ao contrário do observado na combinação tamoxifeno/diosgenina anteriormente estudada, a combinação de flutamida com diosgenina parece inibir a proliferação celular nas concentrações utilizadas, em relação ao controlo (figura 28). É de destacar a variabilidade dos resultados obtidos, o que se reflectiu nos desvios padrões observados. Não podemos concluir se existe um efeito sinérgico, mas foi evidente na observação ao microscópio (parte III do Anexo desta dissertação) que em todas as combinações as células estavam alteradas - mesmo nas concentrações baixas de ambos os compostos as células tinham aspecto arredondado, sugestivo de alterações morfológicas que se podem associar à apoptose. Assim, futuramente, é de equacionar um estudo similar, mas em tempos mais prolongados.



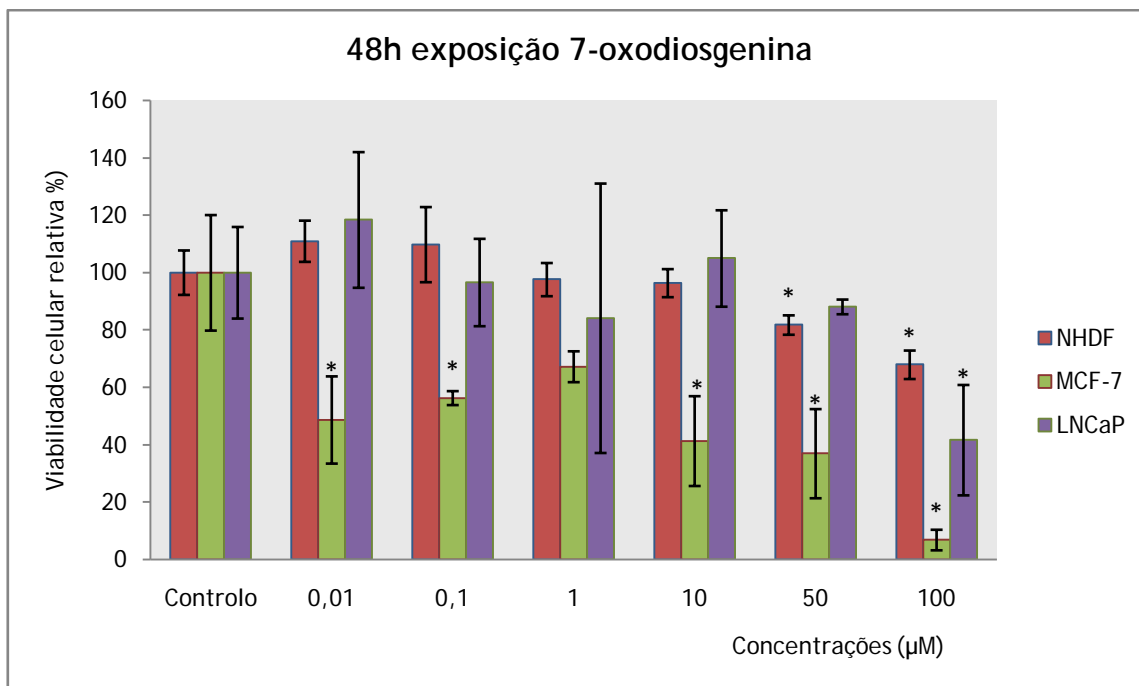
**Figura 27:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com flutamida em concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, durante 48h, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).



**Figura 28:** Viabilidade celular relativa das células LNCaP, incubadas com flutamida (F) e diosgenina (D) em concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M e 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M, respectivamente, durante 48h, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

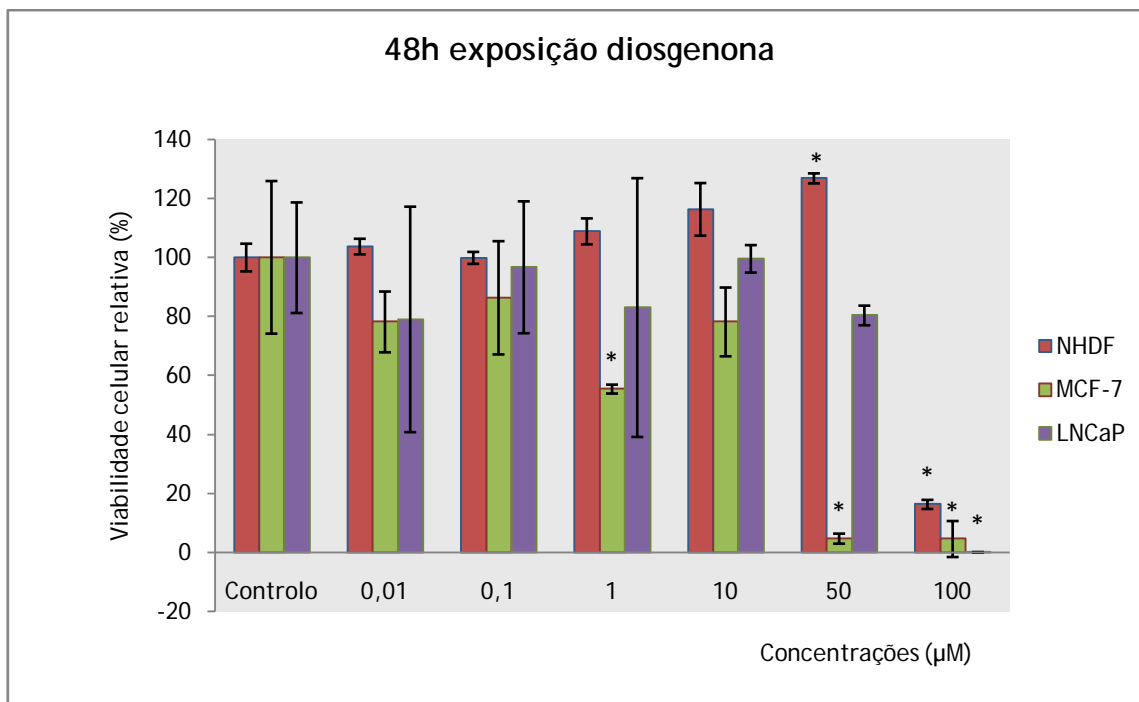
O estudo seguinte a ser efectuado foi a avaliação dos efeitos citotóxicos/antiproliferativos dos derivados oxidados da diosgenina em análise. As células em estudo (MCF-7, LNCaP e NHDF) foram expostas durante 48h aos compostos em concentrações crescentes, e utilizando meio completo, após o qual se realizou o ensaio MTT, conforme descrito. Os resultados estão apresentados nas figuras 29, 30 e 31.

Analisando os resultados que estão representados na figura 29, constata-se que o composto 7-oxodiosgenina diminui a proliferação celular nas células MCF-7, comparativamente ao controlo com diferenças estatisticamente significativas em quase todas as concentrações utilizadas. Nos outros tipos de células, nomeadamente NHDF e LNCaP não se verificam diferenças muito relevantes na proliferação celular em comparação com o controlo, excepto nas concentrações de 50 e 100 $\mu$ M nas células NHDF (embora se mantenha viabilidade celular elevada) e a 100 $\mu$ M nas células LNCaP. Esta diferença no comportamento destas células perante este composto leva-nos a concluir que devemos explorar melhor este efeito, pois a selectividade da acção antiproliferativa para as células MCF-7 pode ser de elevado interesse em terapêutica oncológica no sentido de redução de efeitos secundários noutros tecidos além do tecido mamário.



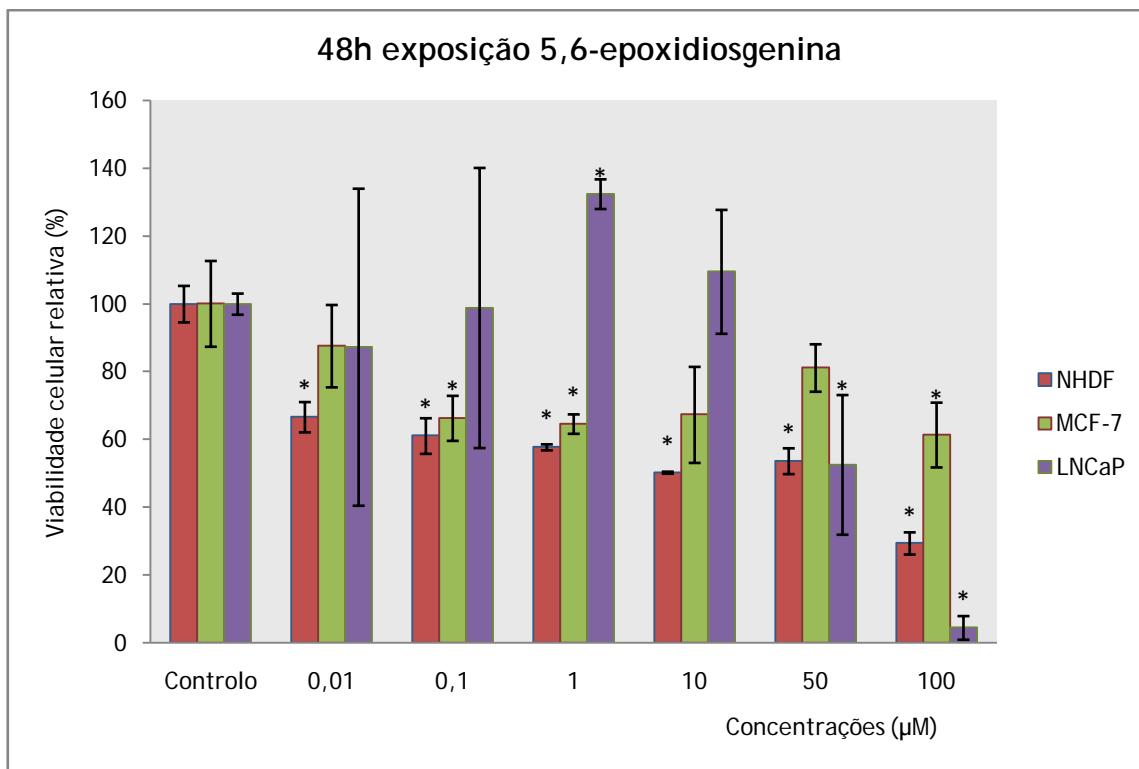
**Figura 29:** Viabilidade celular relativa das células NHDF, MCF-7 e LNCaP, incubadas com 7-oxodiosgenina em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 48h, com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

Relativamente aos dados obtidos com o composto diosgenona (figura 30), observa-se que este composto parece não exercer uma acção antiproliferativa para os três tipos de células estudadas, excepto em concentrações de 100µM. É de realçar, no entanto, que na concentração de 50µM se observa um ligeiro aumento da proliferação nas células NHDF em relação às outras concentrações. Uma explicação a considerar pode ser a função  $\Delta^4$ -3-cetona presente na diosgenona que é similar ao das hormonas esteróides progesterona e testosterona, podendo equacionar-se se a diosgenona poderá ter efeito agonista nos receptores celulares destas hormonas. Ainda observando os resultados obtidos nesta concentração, verifica-se um decréscimo abrupto da viabilidade das células MCF-7 a partir da concentração 50 µM. Na concentração de 100µM, parece haver morte celular de todas as células.



**Figura 30:** Viabilidade celular relativa das células NHDF, MCF-7 e LNCaP, incubadas com diosgenona em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 48h, com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*p<0,05 versus respectivo controlo (teste *t*-student).

Na figura 31, é possível visualizar os resultados correspondentes à viabilidade celular das células NHDF, MCF-7 e LNCaP quando expostas ao composto 5,6-epoxidiosgenina durante 48h. Nesta experiência, verifica-se que não existem muitas diferenças na proliferação celular das células NHDF e MCF-7, uma vez que se observa uma diminuição da proliferação para ambos os tipos de células em relação ao controlo. Nas células LNCaP, observa-se até um aumento da sua proliferação na concentração de 1µM, comparativamente ao controlo. É de realçar a grande variabilidade observada nos resultados das células LNCaP, visível nas linhas correspondentes ao desvio padrão. Esta variabilidade, tal como em outras experiências por nós realizadas nas células LNCaP podem ser explicadas pelo facto de que os cristais de formazano, formados após incubação das células com MTT, se soltavam do fundo dos pocetos e eram, por isso, parcialmente aspirados conjuntamente com o meio de cultura com MTT, antes da adição do DMSO.



**Figura 31:** Viabilidade celular relativa das células NHDF, MCF-7 e LNCaP, incubadas com 5,6-epoxidiosgenina em concentrações entre 0,01µM e 100µM durante 48h, com meio de cultura completo, determinada pelo ensaio MTT. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

No sentido de concretizar o nosso último objectivo, avaliou-se o efeito da diosgenina e dos derivados 7-oxodiosgenina, diosgenona e 5,6-epoxidiosgenina na proliferação de fungos. Para tal, foram utilizadas estirpes comerciais e clínicas de *Candida* e a experiência foi realizada conforme o descrito nas normas da CLSI. Foram utilizadas três concentrações (0,2mg/mL; 1mg/mL; 5mg/mL) de diosgenina e derivados, com as quais as estirpes estiveram em contacto durante 48h. Após este período de incubação, não se observaram halos de inibição relevantes, dado este que não vai ao encontro do descrito na literatura que menciona a acção antifúngica da diosgenina e alguns derivados oxidados. Para todos os ensaios realizados, verificaram-se halos de inibição no controlo positivo (anfotericina B) indicativos da susceptibilidade das estirpes à anfotericina B. É de realçar, a partir destes resultados, a necessidade de novos ensaios com várias concentrações no sentido de se comprovar se de facto os compostos estudados não têm acção antifúngica.

## V - Conclusões

No trabalho experimental desenvolvido, foram estudados os efeitos citotóxicos da diosgenina em células de cancro da mama estrogénio-dependente (MCF-7), em células de cancro da próstata androgénio-dependente (LNCaP) e em culturas primárias de fibroblastos da derme humana (NHDF), em várias concentrações (entre 0,01 e 100  $\mu\text{M}$ ) e em vários tempos de exposição (24h, 48h e 96h nas células MCF-7 e NHDF, e 48h nas células LNCaP), e com e sem recuperação após exposição à diosgenina.

Os resultados mostram que:

- o após 24h de exposição, a diosgenina parece ter maior acção antiproliferativa para as células MCF-7 do que para as NHDF, embora no ensaio de recuperação nas células MCF-7 se verifique que há recuperação da viabilidade celular e até estimulação da proliferação em relação ao controlo após exposição às duas concentrações mais baixas de diosgenina - este resultado sugere que a diosgenina pode interagir com o ER, competindo com o  $\text{E}_2$ , e que, a ter acção estrogénica, essa será inferior à do  $\text{E}_2$ ;
- o após 48h de exposição à diosgenina, verifica-se um efeito antiproliferativo em todas as células a partir da concentração de 10 $\mu\text{M}$  e não se verifica recuperação significativa, excepto para as células LNCaP e NHDF na concentração 0,01  $\mu\text{M}$  de diosgenina, em que até se verifica um efeito proliferativo em relação ao respectivo controlo - a interpretação dada deverá envolver outros efeitos celulares da diosgenina que poderão existir além do seu potencial afeito sobre os ER e AR;
- o após 96h de exposição à diosgenina verifica-se que há um maior efeito antiproliferativo nas células NHDF do que nas MCF-7, embora aqui se verifique que nas células NHDF houve recuperação parcial da sua proliferação no ensaio de recuperação - este resultado é concordante com o facto de as células NHDF serem menos sensíveis aos estrogénios que as MCF-7 e com o resultado observado na experiência de 24h nas células MCF-7 (com recuperação).

A potencial acção estrogénica da diosgenina foi explorada em células MCF-7 e NHDF, utilizando meios de cultura completo (com FBS), meios sem FBS e meios com FBS ao qual foram extraídos os esteróides (com charcoal activado); os resultados obtidos sugerem que a diosgenina não tem acção estrogénica significativa, embora sejam necessários mais estudos para esclarecer esta questão.

Foi avaliada a acção antiproliferativa/citotóxica da diosgenina pela primeira vez em células NHDF e LNCaP, pois não é por nós conhecido qualquer estudo envolvendo a diosgenina nestas células.

A acção antiproliferativa da diosgenina e dos seus derivados oxidados 7-oxodiosgenina, 5,6-epoxidiosgenina e diosgenona foi avaliada, pela primeira vez, em células cancerígenas (MCF-7 e LNCaP) e normais (NHDF) e, quando possível, foi determinado o IC<sub>50</sub>, tal como para as experiências com diosgenina.

O estudo da relação estrutura-actividade citotóxica, nestes estudos, revelou, essencialmente, que:

- o genericamente os três derivados oxidados da diosgenina revelaram ter acção antiproliferativa inferior à do composto-mãe, a diosgenina; este efeito é visível, sobretudo na concentração de 50 µM;
- o a diosgenona parece estimular a proliferação das células NHDF nas concentrações 10 e 50 µM;
- o a 7-oxodiosgenina tem acção antiproliferativa selectiva para as células MCF-7, não inibindo significativamente a proliferação nas células LNCaP e NHDF nas condições experimentais estudadas - este efeito deve ser explorado em estudos futuros para aprofundamento dos conhecimentos dos seus efeitos e continuação da avaliação do seu potencial interesse como agente anticancerígeno no cancro da mama.

A combinação de diosgenina com outros agentes antitumorais, usando meios de cultura completos (com FBS), foi também explorada:

- o o estudo da potencial utilidade da combinação da diosgenina com tamoxifeno (modulador dos ER, usado no tratamento do cancro da mama) na terapêutica de cancro da mama, utilizando as células MCF-7, revelou, não só não existir um efeito sinérgico nem aditivo da acção antiproliferativa dos efeitos destes compostos, como também parece haver um efeito protector das células quando combinados;
- o o estudo da potencial utilidade da combinação da diosgenina com flutamida (modulador dos AR, usado no tratamento do cancro da próstata) na terapêutica de cancro da próstata, utilizando as células LNCaP, revelou que esta combinação parece ter, meramente, um efeito aditivo.

Foi também avaliada a potencial acção antifúngica, especificamente contra várias estirpes de *Candida* (estirpes de referência e isolados clínicos) através do ensaio de difusão em disco, dos derivados oxidados da diosgenina (7-oxodiosgenina, 5,6-epoxidiosgenina e diosgenona) - os resultados não evidenciaram qualquer acção significativa destes compostos contra estas estirpes de *Candida*.

## VI - Referências Bibliográficas

Aradhana, R., Rao A.R., Kale R.K., Diosgenin: a growth stimulator of mammary gland of ovariectomized mouse. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1992, 30: 367-370.

Arkin, M., Protein - protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Current Opinion in Chemical Biology*., 2005, 9: 317-324.

Au, A.L., Kwok C.C., Lee A.T., Kwan Y.W., et al, Activation of iberiotoxin-sensitive,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 502: 123 - 133.

Barros, H., Lunet, N., Cancro Uma Perspectiva de Saúde Pública, *ArquiMed*, 2006, ISSN 0871-3413.

Bayly, A.C., Roberts, R.A., Dive, C., Mechanisms of apoptosis. In: BITTAR, E. E. Advances in molecular and cell biology. *Greenwich, CT: JAI Press*, 1997, 20: 183-229.

Benghuzzi, H., Tucci M., Eckie R., Hughes J., The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 2003, 39: 335-40.

Bergantini, A.P.F., Castro, F.A., Souza, A.M., Fett-Conte, A.C., Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia*, 2005, 27 (2): 120-125.

Björkhem I., Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 110: 725-730.

Bocuzzi G., Brignardello, E., Di Monaco, M., Forte, L., et al, Influence of Dehydroepiandrosterone and 5-En-androstene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol on the Growth of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Induced by 17 $\beta$ -Estradiol. *Anticancer Research*, 1992, 12: 788-804.

Bracke, M. E., Vanhoecke, B.W.A., Derycke, L., Bolca, S., et al, Plant Polyphenolics as Anti-Invasive Cancer Agents. *Anticancer Agents in Medical Chemistry*, 2008, 8: 171-185.

Bras, M., Queenan, B., Susin, S.A., Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, 70 (2): 231-239.

Brodgen, R.N., Chrisp, P., Flutamide: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer. *Drugs Aging*, 1991, 1(2): p.104-115.

Brunel, J., Loncle, C., Vidal, N., Dherbomez, M., et al, Synthesis and antifungal activity of oxygenated cholesterol derivatives. *Steroids*, 2005, 70: 907-912.

Caruso, M. G., Notarnicola, M., Biochemical changes of mevalonate pathway in human colorectal cancer. *Anticancer Research*, 2005, 25: 3393-3397.

Carvalho, J.F., Silva, M.M, Moreira, J.N., Simões, S. et al., Synthesis of Ring-B Oxygenated Steroids, Cytotoxic Profile, and Comprehensive SAR Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53: 7632-7638.

Cepa, M., et al, New steroidal chromatinase inhibitors: suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death. *BMC Cell Biology*, 2008, 9: p. 41.

Cerda, S.R., Correia-da-Silva, G., Silva, E., Roleira, F., et al, Regulation of cholesterol synthesis in four colonic adenocarcinoma cell lines. *Lipids*, 1995, 30: 1083-1092.

Chen, J.H., Wu, J.S., Lin, H., Wu, S.L., et al, *Dioscorea* improves the morphometric and mechanical properties of bone in ovariectomised rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88: 2700-2706.

Chen, X., Sood. S., Yang, C.S, Li, N., et al, Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*, 2006, 6: 613-622.

Chiang, C. T., Way, T.D, Tsai, S.J, Lin, J.K., Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Letters*, 2007, 581: 5735-5742.

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Guideline. *CLSI document M44-A*, 2003, CLSI, Pennsylvania, USA.

Colabufo, N.A., Pagliarulo, V., Berardi, F., Contino, M., et al, Bicalutamide failure in prostate cancer treatment: Involvement of Multi Drug Resistance proteins. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 601: 38-42.

Corbière, C., Liagre, B., Bianchi, A., Bordji, K. et al, Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*, 2003, 22: 899.

Cotran, R. S., et al, Patologia celular I: lesão e morte da célula. In: COTRAN, R.S.; VINAY KUMAR, M.V.; COLLINS, T. Patologia estrutural da célula, 2000, 6: 1-26.

Dumont, P., Ingrassia, L., Rouzeau, S., Ribaucour, F., et al, The *Amaryllidaceae* isocarbostryril Narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia Press (New York)*, 2007, 9: 766-776.

Farr, D. R., Functional foods. *Cancer Letters.*, 1997, 114: 59-63.

Ferreira, C. G., *Oncologia Molecular*, 2004.

Foster, I., Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 2008, 14: p. 144-149.

Furstenberger, G., Krieg, P., Müller-Decker, K., Habenicht, A.J., What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *International Journal of Cancer*, 2006, 119: 2247-2254.

Green, D., Kroemer, G., The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends in Cell Biology*, 1998, 8: 267-271.

Guardiola, F., Codony, R., Savage, G.P., Dutta, P.C., Cholesterol and phytosterol oxydation products: analysis, occurrence, and biological effects. *Champaign: AOCs Press*, 2002, Cap.I.

Guclu-Ustundag, O., Mazza, G., Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutricion*, 2007, 47(3): 231-58.

Horoszewicz, J. S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., et al, LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research*, 1983, 43 (4): 1809-1818.

Hsu, K., Chang, C., Tsai, H., Tsai, F., et al, Effects of yam and diosgenina on calpain systems in skeletal muscle of ovariectomized rats. *Taiwan Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2008, 47(2): 180-185.

Jordan, V.C., Tamoxifen, Raloxifen, and the Prevention of Breast Cancer. *Endocrine Reviews*, 1999, 20(3): 253-278.

Joseph, L., A Natural Approach to Menopause. *Nutricional Science Reports*, 1999, 7: 1-6.

Kitts, D.D., Wijewickreme, A.N., Hu, C., Antioxidant properties of a North American ginseng extract. *Molecular and Cell Biochemistry*, 2000, 203: 1-10.

Kohara, A., Nakajima, C., Hashimoto, K., Ikenaga, T., et al, A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculeatissimum*. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57: 225.

Komen, J., P.A., Wolbers, F., Franke, H., Andersson, H., et al, Viability analysis and apoptosis induction of breast cancer cells in a microfluidic device: effect of cytostatic drugs. *Biomedical Microdevices*, 2008, 10(5): 27-737.

Komesaroff, P.A., Black, C.V., Cable, V., Sudhir, K., Effects of wild yam extract on menopausal symptoms, lipids and sex hormones in healthy menopausal women. *Climacteric*, 2001, 4: 144-150.

Kufe, D. W., Prevention of Invasive Breast Cancer in Women at Increased Risk. *Cancer Medicine*, 2003, 6 (31): 121.

Kuwana, T., Newmeyer, D., Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15: 691-699.

Labrie, F., Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS. *Important advances in oncology*, 1985, p. 193-217.

Lavin, M. R., Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. *Journal of Psychiatry*, 1993, 150: 1752-3.

Léger, D.Y., Liagre, B., Corbière, C., Cook-Moreau, J., et al, Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA<sub>2</sub> and COX-2 overexpression. *International Journal of Oncology*, 2004, 25: 555.

Levenson, A.S., Jordan, V.C, MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 1997, 57 (15): 3071-3978.

Li, J., Liu, X., Guo, M., Liu, Y., Liu, S., et al, Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of diosgenin. *Analytical Sciences*, 2005, 21: 561.

- Liagre, B., Bertrand, J., Leger, D.Y., Beneytout, J.L., Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF- $\kappa$ B binding. *International Journal of Molecular Medicine*, 2005, 16: 1095-1101.
- Liao, X., Tang, S., Thrasher, J., Griebing, T., et al, Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapies*, 2005, 4(4): 505-515.
- Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquiere, L., et al, Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999, 19: 1190-1200.
- Marona H., Storti, M., Neto, V., Flutamide: a review of its pharmacological and physico-chemical properties. Methods for analysis of pharmaceutical formulas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2004, 50 (1): 37-44.
- Marsh, S., Liu, G., Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61: 381-387.
- McAnuff-Harding, M.A., Omoruyi, F.O., Asemota, H.N., Intestinal disaccharidases and some renal enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). *Life Sciences*, 2006, 78: 2595-2600.
- Melo, P.S., De Azevedo, M.B., Zullo, M.A., Fabrin-Neto, J.B., et al, Cytotoxicity of the phytosterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. *Human & Experimental Toxicology*, 2004, 23: 487-493.
- Menendez, J.A., Lupu, R., Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7: 763-777.
- Menendez, J.A., Vellon, L., Colomer, R., Lupu, R., Pharmacological and small interference RNA-mediated inhibition of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) synergistically enhances Taxol (paclitaxel)-induced cytotoxicity. *International Journal of Cancer*, 2005, 115: 19-35.
- Moalic, S., Liagre, B., Corbière, C., Bianchet, A., et al, A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Letters*, 2001, 506: 225.

Nappez, C., Changes in lipoxygenase activities in human erythroleukemia (HEL) cells during diosgenin-induced differentiation. *Cancer Letters.*, 1995, 96: 133-140.

Narula, A., Kumar, S., Srivastava, P.S., Genetic fidelity of in vitro regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera L.*, a potential alternative source of diosgenin. *Biotechnology Letters*, 2007, 29: 623-629.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., et al, Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 2009, 59: 365-378.

Noguchi, E., Fujiwara, Y., Matsushita, S., Ikeda, T., et al, Metabolism of tomato steroidal glycosides in humans. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 54: 1312.

Notarnicola, M., Messa, C., Pricci, M., Guerra, V., et al, Upregulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in left-sided human colon cancer. *Anticancer Research*, 2004, 24: 3837-3842.

Ouellet, É., Ayan, D., Poirier, D., Synthesis and preliminary evaluation of a modified estradiol-core bearing a fused  $\gamma$ -lactone as non-estrogenic inhibitor of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21: 5510-5513.

Price, K. R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R., The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 1987, 26: 27-135.

Prunet, C., Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 2005, 19: 311-326.

Quan, H.J., Koyanagi, J., Fusao, K., Saito, S., Preparations of vitamin D analogs, spirostanols and furostanols from diosgenin and their cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 40: 662-673.

Quan, H.J., Koyanagi, J., Ohmori, K., Uesato, S., et al, Preparations of heterospirostanols and their pharmacological. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, 37: 659-669.

Raju, J., Bird, R., Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Letters*, 2007, 255: 194-204.

Raju, J., Mehta, R., Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutricion and Cancer*, 2009, 61(1): 27-35.

Raju, J., Patlolla, J., Swamy, M., Rao, C., Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek), Inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2004, 13: 1392.

Rao, K. N., The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis. *Anticancer Research*, 1995, 15: 309-314.

Robbins & Cotran, Pathologic Basis of Disease, 2009, 8th edition.

Sautour M., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Dongmo, A., et al, Antifungal Steroid Saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Letter Planta Medica*, 2004, 70: 90-92.

Saxena, A., Ramchandani, S., Dwivedi, A., Sharma, R., et al, Simplified cryopreservation of mammalian cells lines. *In vitro cellular & Development Biology-Animal*, 1995, 31 (5): 326-329.

Schmitt, M., Klinga, K., Schnarr, B., Morfin, R., et al, Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in MCF-7 cells after conversion to estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 173: 1-13.

Scott, A., Higdon, K., Benghuzzi, H., Tucci, M., et al, TCPL drug *delivery system: the effects of synthetic DHEA and diosgenin using an ovariectomized rat model*. *Biomedical Sciences Instrumentations*, 2000, 36: 171-176.

Silva, M., Estudo térmico e cinético de precursores naturais de hormônios. Programa de Pós Graduação em Química, UFP, 2008, Dissertação de mestrado, p. 4.

Smith, L.L., Mechanisms of formation of oxysterols: a general survey. In: Crastes de Paulet A, Douste-Blazy L, Paoletti R(Editors), Free radicals, lipoproteins, and membrane lipids. New York: Plenum Press, 1990, 115-132.

Son, Y. O., Kim, J., Lim, J.C., Chung, Y., et al, Ripe fruits of *Solanum nigrum* inhibits growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41: 1421-1428.

Sowmyalakshmi S., Ranga, R., Gairola G., Chendil, D., Effect of diosgenin (fenugreek) on breast cancer cells. *American Association of Cancer Research*, 2005, 46.

- Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., Venguswamy, G., et al, Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells, *International Journal of Cancer*, 2009, 125: 961-967
- Taylor, W. G., Elder, J.L., Chang, P.R., Richards, K.W., Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48: 5206-5210.
- Trouillas, P., Corbière, C., Liagre, B., Duroux, J.L., et al, Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13: 1141-1149.
- Tucci, M., Benghuzzi, H., Structural changes in the kidney associated with ovariectomy and diosgenin replacement therapy in adult female rats. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 2003, 39: 341-6.
- Turchan-Cholewo, J., Liu, Y., Gartner, S., Reid, R., et al, Increased vulnerability of ApoE4 neurons to HIV proteins and opiates: Protection by diosgenin and L-deprenyl. *Neurobiology of Disease*, 2006, 23: 109.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos, J., Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 731: 237-245.
- Vejux A., Malvitte, L., Lizard, G., Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2008, 41(7): 545-556.
- Wang, H., Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, 45: 304-309.
- Williams, J.R., Gong, H., Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavoninins. *Lipids*, 2007, 42: 77.
- Xu, G., McLeod, H., Strategies for enzyme/Prodrug cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7: 3314-3324.
- Yang C.R., Ying, Z., Jacob, M.R., Khan, S.I., et al, Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, 50 (5): 1710-1714.

Yasuhara, S., Zhu, Y., Matsui, T., Tipirneni, N., et al, Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2003, 51: 873-885.

Yen, M.L., Su, J.L., Chien, C.L., Tseng, K.W., et al, Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Molecular Pharmacology*, 2005, 68: 1061-1073.

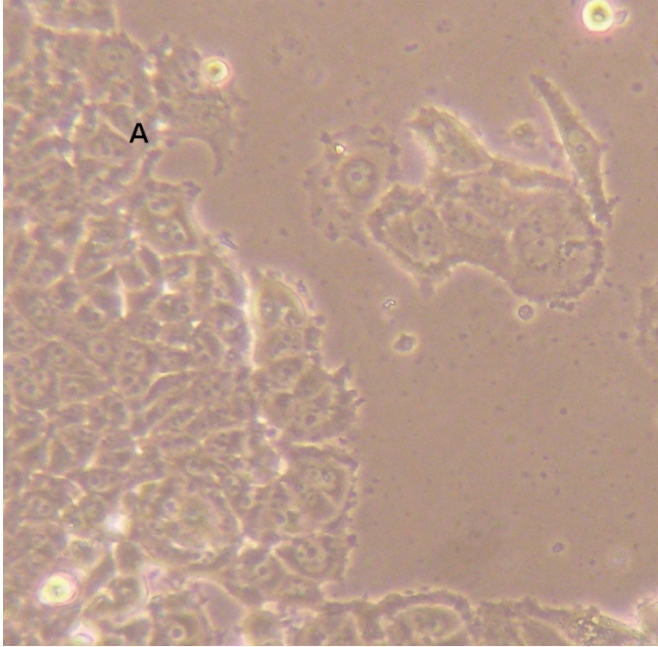
Yu, D., Liu, B., Tan, M., Li, J., et al, Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene*, 1996, 13: 1359-1365.

# ANEXO

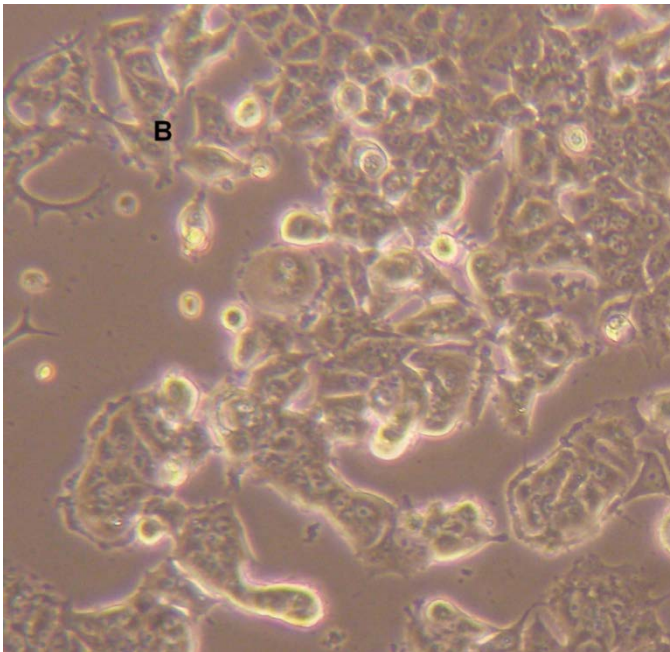
I. Tabela dos valores de valores de IC<sub>50</sub> calculados a partir dos dados obtidos das várias experiências realizadas envolvendo 48h de exposição das células MCF-7, NHDF e LNCaP aos compostos em estudo

Composto esteróide	MCF-7 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	NHDF IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	LNCaP IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
diosgenina (48h sem REC)	21,37 (R <sup>2</sup> = 0,7335)	32,16 (R <sup>2</sup> =0,9644)	0,09 (R <sup>2</sup> =0,8732)
diosgenina (48h com REC)	21,11 (R <sup>2</sup> =0,9164)	18,02 (R <sup>2</sup> =0,9375)	4,42 (R <sup>2</sup> =0,7321)
diosgenina (48h FBS-CH)	11,40 (R <sup>2</sup> =0,8787)	71,13 (R <sup>2</sup> =0,8826)	8,90 (R <sup>2</sup> =0,9395)
7-oxodiosgenina (48h sem REC)	>100 (R <sup>2</sup> =0,6888)	63,04 (R <sup>2</sup> =0,8027)	ND
diosgenona (48h sem REC)	59,58 (R <sup>2</sup> =0,7940)	ND	ND
5,6-epoxidiosgenona (48h sem REC)	ND	ND	>100 (R <sup>2</sup> =0,6736)

II. Fotografias efectuadas às células MCF-7 após exposição a 30 $\mu$ M de diosgenina durante 48h, usando meio DMEM com FBS, e sem período de recuperação (Ampliação de 100X - microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ)

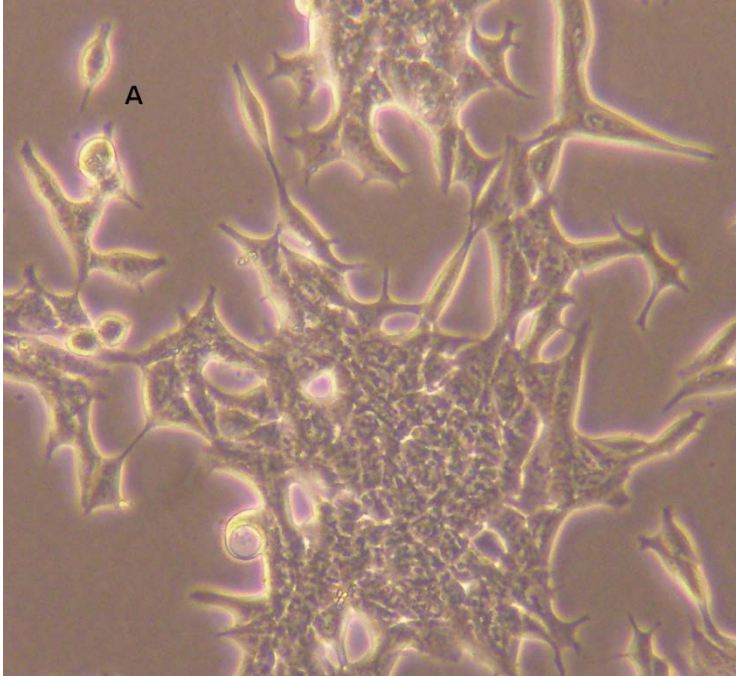


A. Controlo (sem diosgenina)

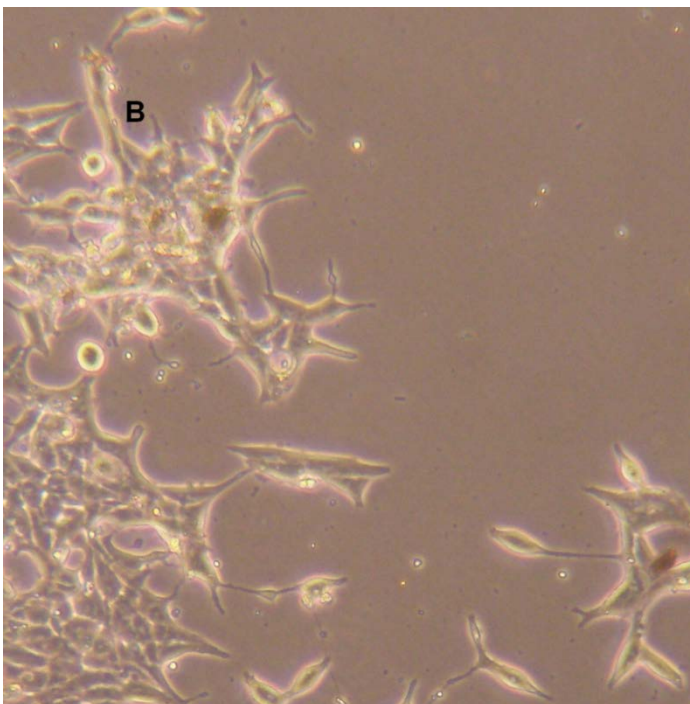


B. Células expostas a 30 $\mu$ M de diosgenina durante 48h - observam-se ligeiras alterações morfológicas celulares, com algumas células a apresentar aspecto arredondado

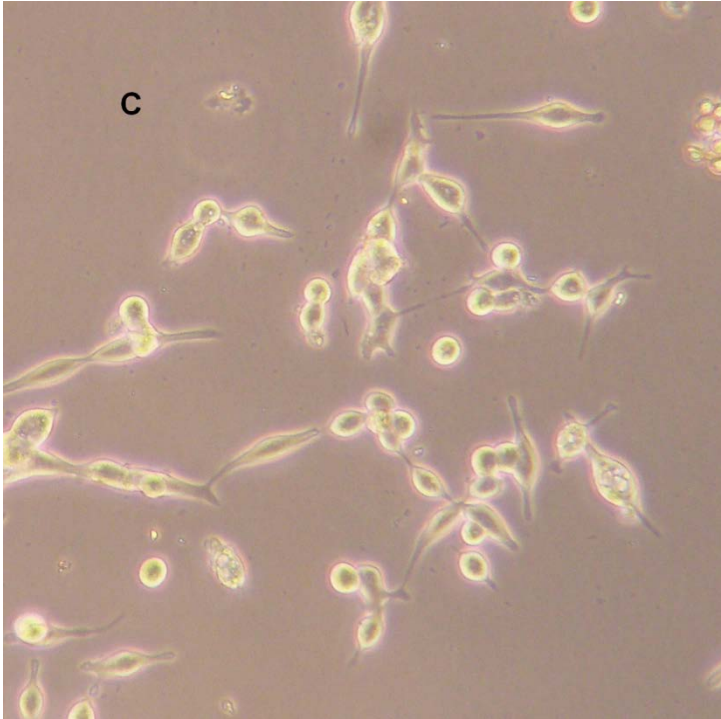
III. Fotografias efectuadas às células LNCaP, respeitantes à experiência da combinação de diosgenina (10 e 20 $\mu$ M) com flutamida (1,10 e 100  $\mu$ M), durante 48h, usando meio RPMI 1640 com FBS, e sem período de recuperação (Ampliação de 100X - microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ)



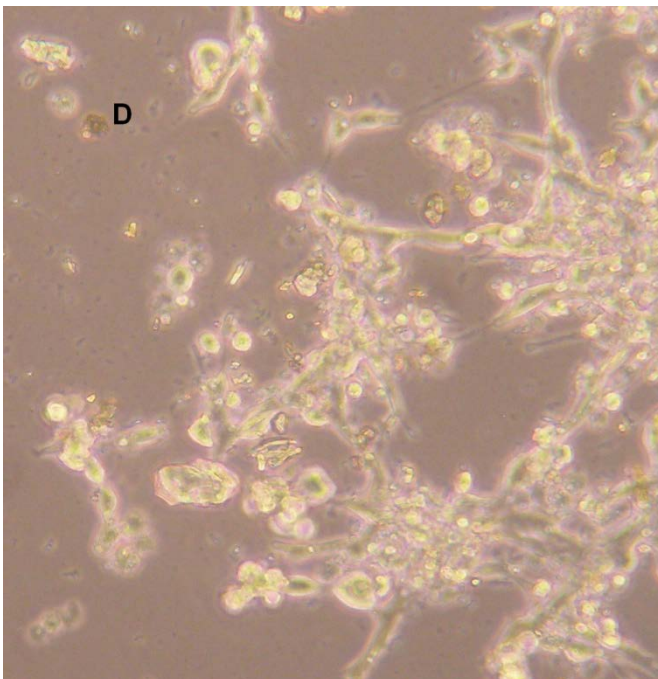
A. Controlo (sem diosgenina nem flutamida)



B. Células expostas a 100 $\mu$ M de flutamida durante 48h - sem alterações morfológicas significativas observáveis ao microscópio



C. Células expostas a 10 $\mu$ M de diosgenina em combinação com 1  $\mu$ M de flutamida durante 48h - observam-se alterações morfológicas celulares relevantes, com muitas células a apresentar aspecto arredondado



D. Células expostas a 20 $\mu$ M de diosgenina em combinação com 100  $\mu$ M de flutamida durante 48h - observam-se alterações morfológicas celulares relevantes e significativa destruição celular