



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

**Avaliação *invitro* de potenciais combinações  
quimioterapêuticas para a terapia de tumores da  
mama e da próstata**

**Sara dos Santos Ferreira Rinaldi**

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

Orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre  
Co-orientadores: Prof. Doutora Luiza Granadeiro  
Prof. Doutora Adriana Santos

**Covilhã, Outubro de 2013**



Ao meu avô já falecido, aos meus pais,  
irmãs e sobrinhos...



*“Aprender uma coisa significa entrar em contato com um mundo do qual não se fazia a menor ideia. É preciso ser humilde para aprender.”*

*Paulo Coelho*



# Agradecimentos

A realização desta dissertação finaliza uma etapa importante da minha vida académica e pessoal e só se tornou possível com a preciosa colaboração e a amizade incondicional de várias pessoas a quem quero agradecer.

Uma das minhas primeiras palavras de enorme reconhecimento e agradecimento são dirigidas ao meu orientador Professor Doutor Samuel Silvestre. Agradeço especialmente por todo o apoio, disponibilidade, conhecimentos transmitidos, paciência e orientação científica.

Às Professoras Doutora Luíza Granadeiro e Professora Doutora Adriana Santos por toda a partilha de sabedoria, colaboração e co-orientação.

A todos os docentes do curso de Ciências Biomédicas da Universidade da Beira Interior que em muito contribuíram para a minha formação académica.

À minha colega de laboratório, e amiga Sara Silva, pelas trocas de conhecimento, palavras de ânimo e companheirismo.

Às minhas amigas, Anaísa e prima Rita, por todos os momentos vividos, pela companhia e palavras de força durante este percurso.

Aos meus amigos de curso, em especial à Juca, Mariana, Bb e Manú, por todo o companheirismo e entreaajuda no meu percurso académico e pelas histórias vividas que sempre recordarei com enorme nostalgia e alegria.

À Mafalda por estar sempre presente, pela alegria e amizade depositada em todos os momentos.

À Guida pelas constantes palavras de incentivo, e carinho.

Às minhas irmãs pela amizade e por contribuírem para o meu crescimento.

Aos meus sobrinhos, pela alegria, pelo amor e pela compreensão.

Aos meus pais uma palavra de reconhecimento muito especial, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, souberam ajudar-me. Por sempre me incentivarem perante os desafios, a fazer mais e melhor e nunca desistir dos sonhos, quero partilhar convosco a alegria de os conseguir concretizar! À restante família que sempre me encorajou a prosseguir, bem como a todos aqueles que direta ou indiretamente incentivaram e facilitaram a sua concretização, bem-haja.



## Resumo

O Cancro, atualmente, é considerado uma das principais causas de morte no mundo. Esta doença oncológica não escolhe idade, género, classe social ou raça e, por conseguinte, constitui um grave problema de Saúde Pública. É considerado a doença com maior impacto económico no mundo, devido às mortes provocadas, à perda de produtividade e aos recursos financeiros necessários para o seu tratamento e sua prevenção. Os cancros hormono-dependentes, entre os quais se destacam os cancros da próstata e da mama, são dos mais frequentes. Apesar de serem conhecidos vários agentes quimioterapêuticos no seu tratamento, os efeitos secundários severos e a baixa eficácia a si associadas levam à investigação de novas estratégias terapêuticas eficientes no combate a esta doença. Para tal, o desenvolvimento de novos compostos com ação anticancerígena é de elevado interesse para a resolução desta enfermidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e determinar a ação de potenciais combinações de agentes quimioterapêuticos no tratamento destes tipos de cancro. A diosgenina, sapogenina esteróide proveniente de plantas, tem funções biológicas importantes agindo como regulador de processos fisiológicos nas plantas e animais. Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado a potencial ação anticancerígena da diosgenina, cujo mecanismo passa pela inibição da proliferação e morte celular, no tratamento de diversos cancros. Para o tratamento dos cancros da mama e da próstata atualmente recorre-se frequentemente ao uso dos fármacos - Tamoxifeno e Flutamida, respetivamente. Assim, considerando esta conhecida ação antiproliferativa e a utilização dos mesmos como agentes anticancerígenos, foram efetuados estudos da sua combinação com a Diosgenina, em células MCF-7 e LNCaP, respetivamente. O interesse pela Diosgenina como agente anticancerígeno foi evidenciado pelos resultados obtidos. Entre outros resultados, verificou-se que em concentrações elevadas, as combinações dos compostos manifestam efeito antiproliferativo marcado, tanto nas células MCF-7 como LNCaP. Contudo, não foram evidenciados efeitos aditivos nem sinérgicos a destacar.

## Palavras-chave

agente anticancerígeno , Diosgenina, Tamoxifeno, Flutamida, cancro da mama, cancro da próstata



## **Abstract**

Actually, Cancer is considered one of the principle causes of death in the world. This oncologic disease does not choose age, gender, social class or race, wherefore, is a major public health problem. It is considered the disease with major impact in the economic world, due to deaths, the loss of productivity and the financial resources required for its treatment and prevention. The hormone-dependent cancers, among which stand out breast and prostatic cancer, are the most frequent in the world. Although they are known many chemotherapeutical agents for its treatment, the severe side effects and the low effectiveness associated with it, lead to the search for new effective therapeutic strategies in fighting the disease. For this, the development of new compounds with anticancer action is of high interest for the resolution of this disease. In this context, the aim of this work was evaluate and determine the action of potential combinations of chemotherapeutical agents in the treatment of these types of cancer. Diosgenin and steroid saponin found in plants, have important biological functions acting has physiologic processes regulator in plants and animals. Lately, many studies have shown a anticancer potential action of diosgenin, whose mechanism involves the inhibition of proliferation and cell death in the treatment of various cancers. For breast and prostatic cancer, often relies on the use of Tamoxifen and Flutamide respectively, considering this known antiproliferative action and the use of the same as anticancer agents, studies have been conducted combining these two compounds with Diosgenin, in MCF-7 cells such as LNCaP, but however, do not appear to exist any additive or synergistic effects to highlight.

## **Keywords**

anticancer agent, diosgenin, tamoxifen, flutamide, breast cancer, prostatic cancer.



# Índice

I. Introdução .....	1
I.1 Cancro.....	1
I.1.1 Desenvolvimento do Cancro .....	1
I.2 Cancros Hormono-dependentes .....	2
I.2.1 Cancro da Próstata .....	3
I.2.1.1 Desenvolvimento do CP .....	3
I.2.1.2 Tratamento do CP .....	4
I.2.2 Cancro da Mama .....	6
I.2.2.1 Desenvolvimento do CM .....	7
I.2.2.1.1 Influência hormonal no CM .....	7
I.2.2.2 Tratamento do CM.....	8
I.2.2.2.1 Recurso a antiestrogénios .....	9
I.2.2.2.2 Inibidores da Aromatase .....	10
I.3 - Potenciais novos agentes quimioterapêuticos .....	11
I.3.1 Diosgenina .....	11
I.3.1.1 Origem e características gerais .....	11
I.3.1.2 Importância, actividade biológica e mecanismos de atuação .....	12
I.3.1.3 Combinação da diosgenina com agentes anticancerígenos.....	17
II. Objetivos.....	19
III. Parte experimental.....	21
III.1 Material .....	21
III.1.1 Compostos, soluções e meios de cultura .....	21
III.1.2 Instrumentação .....	21
III.2 Linhas celulares.....	21
III.2.2 Células LNCaP .....	22
III.3 Manutenção das linhas celulares.....	23
III.3.1 Preparação de meios de cultura .....	23
III.3.2 Descongelamento .....	24
III.3.3 Tripsinização .....	24
III.3.4 Contagem e sementeira de células .....	25
III.4 Compostos testados nas linhas celulares.....	26
III.4.1 Diosgenina .....	26
III.4.2 Tamoxifeno .....	26
III.4.3 Flutamida .....	26
III.4.4 Combinações de compostos.....	26

III.4.4.1 Diosgenina e Tamoxifeno .....	26
III.4.4.2 Diosgenina e Flutamida .....	27
III.5 Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular .....	28
III.5.1 Procedimento geral .....	28
III.5.2 Ensaio de proliferação celular (MTT) .....	28
III.5.3 Microscopia de fluorescência - Método de coloração dupla de Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio.....	29
III.5.4 Citometria de fluxo .....	30
III.6 Análise Estatística.....	31
IV. Resultados e Discussão .....	33
IV.1. Efeito dos compostos na viabilidade celular das células MCF-7 e LNCaP .....	33
IV.1.1 Ensaios de proliferação celular (Ensaio MTT) .....	33
IV.1.2 Análise da frequência de morte celular por microscopia de fluorescência .....	40
IV.1.3 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo .....	48
V. Conclusão .....	55
VI. Bibliografia .....	57
Anexo .....	63

# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da Diosgenina (Patel, K. <i>et al.</i> 2012). .....	12
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática dos possíveis alvos moleculares e celulares da ação da diosgenina Adaptado de (Raju, J. and Rao, C. V. 2011).....	13
<b>Figura 3:</b> Via intrínseca da apoptose. Apaf-1- Fator de ativação de protease associada à apoptose. (Grivicich, I. <i>et al.</i> 2007). .....	16
<b>Figura 4:</b> Características de morte celular: apoptose e necrose(Grivicich, I. <i>et al.</i> 2007). ...	17
<b>Figura 5:</b> Células MCF-7 Passagem 29 (20X). .....	22
<b>Figura 6:</b> Células LNCaP Passagem 23 (20X). .....	23
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo da sementeira em placas de 48multiwells quando se estudou cada composto isoladamente; Z= zeros; C= controlo (apenas suspensão celular), aos restantes poços foram adicionados também 250µl da suspensão celular e, posteriormente, diferentes concentrações dos compostos. ....	25
<b>Figura 8:</b> Esquema representativo da distribuição dos compostos Diosgenina (D10= Diosgenina 10µM;D50= Diosgenina 50µM) e Tamoxifeno (T10= Tamoxifeno 10µM; T20µM= Tamoxifeno 20µM) e suas combinações (D10T10=Diosgenina 10µM com Tamoxifeno 10µM;D10T20= Diosgenina 10µM com Tamoxifeno 20µM;D50T10=Diosgenina 50µM com Tamoxifeno 10µM;D50T20= Diosgenina 50µM com Tamoxifeno 20µM). C= Controlo; Z=Zeros. ....	27
<b>Figura 9:</b> Esquema representativo da distribuição dos compostos Diosgenina (D1= Diosgenina 1µM; D50= Diosgenina 50µM) e Flutamida (F10= Flutamida 10µM; F100µM= Flutamida 100µM) e suas combinações (D1F10= Diosgenina 1µM com Flutamida 10µM;D1F100= Diosgenina 1µM com Flutamida 100µM;D50F10= Diosgenina 50µM com Flutamida 10µM;D50F100= Diosgenina 50µM com Flutamida 100µM). C= Controlo; Z=Zeros.....	28
<b>Figura 10:</b> Regiões definidas para análise da distribuição do ciclo celular, por citometria de fluxo. R1: Região com eventos marcados; R2: Região de singletos e <i>debris</i> . ....	31
<b>Figura 11:</b> Proliferação celular relativa das células MCF-7 incubadas por 48 horas com Diosgenina, nas concentrações de 0,01µM a 100µM em meio de cultura DMEM com FBS. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. *p<0,05 <i>versus</i> respectivo controlo (teste <i>t</i> -student). ....	33
<b>Figura 12:</b> Proliferação celular relativa das MCF-7 incubadas por 48 horas com Tamoxifeno, nas concentrações de 0,1µM-30µM e meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas os desvios padrão. *p <0,05 <i>versus</i> respetivo controlo (teste <i>t</i> -student). ....	35
<b>Figura 13:</b> Proliferação celular relativa das MCF-7 incubadas por 48 horas com combinações de compostos, nas concentrações representadas no gráfico Dios - Diosgenina (D); Ta -	

Tamoxifeno; em meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as e as linhas os desvios padrão. *p <0,05 versus respectivo controlo (teste <i>t-student</i> ). .....	36
<b>Figura 14:</b> Proliferação celular relativa das LNCaP incubadas, por 48 horas, com Diosgenina, nas concentrações de 0,01µM-100µM e meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. *p< 0,05 versus respectivo controlo (teste <i>t-student</i> ).....	37
<b>Figura 15:</b> Proliferação celular relativa das LNCaP incubadas, por 48 horas, com Flutamida, nas concentrações de 0,01µM-100µM e meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas, o desvio padrão (na figura 10). *p<0,05 versus respectivo controlo (teste <i>t-student</i> ).....	38
<b>Figura 16:</b> Proliferação celular relativa das LNCaP incubadas por 48 horas com combinações de compostos, nas concentrações representadas no gráfico, D - Diosgenina; F - Flutamida; em meio de cultura RPMI com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respectivo controlo (teste <i>t-student</i> ). .....	40
<b>Figura 17:</b> Análise de microscopia de fluorescência nas células MCF-7. Controlo negativo para apoptose: células em cultura apenas em meio DMEM com FBS. Controlo positivo para apoptose: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; Dios: Diosgenina; Ta: Tamoxifeno; Frequência de morte celular expressa em percentagem (%). .....	41
<b>Figura 18:</b> Análise de microscopia de fluorescência nas células LNCaP. Controlo negativo para apoptose: células em cultura apenas em meio RPMI 1640 com FBS. Controlo positivo para apoptose: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; Dios: Diosgenina; F: Flutamida; Frequência de morte celular expressa em percentagem (%) (n=1). .....	42
<b>Figura 19:</b> Micrografias fluorescentes das células MCF-7, após tratamento de 48 horas com os compostos. Ampliações: A- 10X; B-40X; 1 - Controlo, células tratadas apenas com meio DMEM com FBS. 2- Células expostas a Diosgenina 10µM; 3- Células expostas a Tamoxifeno 10µM; 4- Células expostas a Diosgenina10µM+Tamoxifeno10µM; 5- Células expostas a Diosgenina 50µM; 6- Células expostas a Diosgenina50µM+Tamoxifeno10µM; Para n=1, ≥100 células por condição. ....	45
<b>Figura 20:</b> Micrografias fluorescentes das células LNCaP, após tratamento de 48 horas com os compostos. Ampliações: A- 10X; B-40X; 1 - Controlo, células tratadas apenas com meio RPMI com FBS. 2- Células expostas a Diosgenina 1µM; 3- Células expostas a Flutamida 10µM; 4- Células expostas a Diosgenina1µM+Flutamida10µM; 5- Células expostas a Diosgenina 50µM; 6- Células expostas a Flutamida 100µM; 7- Células expostas a Diosgenina 1µM+Flutamida100µM; Para n=1, ≥100 células por condição. ....	47

<b>Figura 21:</b> Análise do ciclo celular das células MCF-7. Controlo: Células em meio DMEM com FBS, sem qualquer tratamento de composto. N° total de eventos analisados = 9790. ....	48
<b>Figura 22:</b> Análise do ciclo celular às células MCF-7 expostas a Diosgenina 10µM (D10) (Histograma a cheio e cinzento) comparativamente ao Controlo (Histograma a vermelho). N° total de eventos analisados: 9201. ....	49
<b>Figura 23:</b> Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas a Diosgenina 50µM (D50). N° total de eventos adquiridos: 9035 (100%). Região M1: Região de <i>Debris</i> . ....	49
<b>Figura 24:</b> Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas a Tamoxifeno 10µM (T10) comparativamente com o controlo. N° total de eventos: 9674. ....	50
<b>Figura 25:</b> Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas a Tamoxifeno 20µM (T20) comparativamente ao controlo. N° total de eventos adquiridos: 8925. Região M1 - região de <i>Debris</i> . ....	51
<b>Figura 26:</b> Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas à combinação de Diosgenina10µM+ Tamoxifeno10µM (D10T10). N° total de eventos adquiridos: 8363. ....	52
<b>Figura 27:</b> Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas à combinação Diosgenina10µM+Tamoxifeno20µM (D10T20). N° total de eventos: 9517. ....	52



# Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Atividade anticancerígena da diosgenina - estudos *in vitro*. PARP, poli polimerase (adenosina ribose-difosfato) - Adaptado de (Raju, J. and Rao, C. V. 2011). ..... 14



## Lista de Acrónimos

AD	Androstenediona
BRCA1	Gene supressor cancro da mama 1
BRCA2	Gene supressor cancro da mama 2
BP	Filtro Passa Banda
CM	Cancro da Mama
CP	Cancro da Próstata
CPA	Acetato ciproterona
CYP17	Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase-C <sub>17,20</sub> -liase
CYP19	Citocromo P450 aromatase
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	dihidrotestosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Recetor de estrogénios
ER+	Recetor estrogénio positivo
ER-	Recetor estrogénio negativo
FBS	Soro bovino fetal
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas
IAs	Inibidores da Aromatase
IC <sub>50</sub>	Concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
LNCaP	Lymph node carcinoma of the prostate
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7

MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	Poli polimerase (adenosina ribose-difosfato)
PSA	Antigénio específico da próstata
PBS	Tampão fosfato salino
RA	Recetor de androgénios
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Recetor de progesterona
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SERMs	Moduladores seletivos dos recetores de estrogénios
Ta	Tamoxifeno
TPA	Terapia de privação de androgénios

# I. Introdução

## I.1 Cancro

O Cancro, atualmente, é considerado uma das principais causas de morte no mundo. Esta doença oncológica não escolhe idade, género, classe social ou raça e, por conseguinte, constitui um grave problema de Saúde Pública. Apesar dos extraordinários avanços científicos, estima-se que, em 2008, existiam 12.7 milhões de casos e faleceram vítimas de cancro cerca de 7,6 milhões de pessoas (Jemal, A. *et al.* 2011), correspondendo, assim, a 13% do número de mortes mundiais. De assinalar que, também na Europa, a doença oncológica é a segunda principal causa de mortalidade e morbilidade, com estimativas de cerca de 3 milhões de novos casos e 1,700 milhões de mortes, por ano (OMS 2013). Em Portugal, estima-se que, por ano, o número de vítimas mortais, causadas pelo cancro, seja de 25 mil pessoas. Hoje, assiste-se a um maior número de incidências cancerígenas e de doentes oncológicos. Este aumento, deve-se a uma maior esperança de vida que, por si só, potencia o risco de doença, mas também devido aos meios de diagnóstico terem sofrido uma enorme evolução e esses diagnósticos serem efetuados precocemente (Nunes, P. *et al.* 2010). São vários os fatores de risco que contribuem para o seu aparecimento, pois, o atual estilo de vida da sociedade leva a um aumento da exposição a agentes ambientais, químicos, nutricionais e hormonais potencialmente cancerígenos (Jemal, A. *et al.* 2011).

O cancro é, sem dúvida, considerada a doença com maior impacto económico no mundo, devido às mortes provocadas, à perda de produtividade e aos recursos financeiros necessários para o seu tratamento e sua prevenção. Em Portugal, estima-se que os custos diretos com esta doença, relativamente a tratamentos e hospitalizações, sejam de cerca de 53 euros per capita por ano (LPCC 2013). Assim sendo, realça-se que a sua prevenção e tratamento são de crucial importância e dos maiores desafios científicos da atualidade.

### I.1.1 Desenvolvimento do Cancro

O desenvolvimento de um tumor é um processo complexo, com várias etapas. O cancro é uma doença genética, na qual, a sua iniciação e progressão ocorrem quando existem alterações nos genes que controlam certas funções necessárias para a vida normal de uma célula, como por exemplo a proliferação, a migração e a morte celular. Existem três principais tipos de genes relacionados com o cancro e que desempenham um importante papel na sua iniciação: proto-oncogenes, que podem ser transformados em oncogenes quando sofrem uma alteração; genes supressores de tumor; genes envolvidos na reparação do DNA (Butcher, L. D. B., C Richard 2012; Semi, K. *et al.* 2013). Os oncogenes codificam proteínas responsáveis pela sobrevivência celular e também podem aumentar a expressão dos genes das ciclinas e das quinases ciclina dependentes (ciclina dependent-kinase, CDK) sendo, assim, responsáveis pela progressão das células nas diversas fases do ciclo celular (Perry, A. R. 2001). Estes genes são, portanto, promotores do crescimento e da diferenciação celular controlando, por exemplo os fatores de crescimento ou os seus recetores. Por sua vez, uma alteração nos genes

supressores de tumor (genes envolvidos na prevenção da proliferação celular) pode levar a uma proliferação celular desregulada.

A carcinogénese é um processo complexo que compreende várias etapas, entre as quais se salientam a iniciação, a promoção e a progressão. A iniciação caracteriza-se pela exposição das células a agentes físicos ou químicos que afetem os genes acima mencionados e pela formação de clones celulares atípicos. Na fase de promoção observa-se a multiplicação das células atípicas. Já a fase da progressão e malignidade das células diz respeito à fase em que as células apresentam autonomia para proliferar, perdem coesão e ganham mobilidade (Farber, E. 1988; Mareel, M. and Leroy, A. 2003). As principais mudanças fisiológicas na célula maligna em relação às células normais são: auto-suficiência de sinais de crescimento; potencial ilimitado de replicação; perda da inibição de crescimento; evasão à morte celular programada (apoptose) e capacidade invasiva para outros tecidos (metastização) (Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011).

As alterações que contribuem para o desenvolvimento de um tumor são, essencialmente, a ativação anormal e mutações nos genes acima referidos, que originam a perda de controlo da divisão celular e conferem às células cancerígenas vantagens no crescimento e sobrevivência, possibilitando o seu comportamento agressivo. Apesar dos avanços científicos, nesta área, ainda não se sabe especificamente qual o papel de cada mutação na carcinogénese. As mutações podem ter origem em diversos fatores, entre os quais: a exposição excessiva a carcinogéneos (químicos, virais ou radiação); inflamação crónica; causas hereditárias; idade do indivíduo; entre outros fatores (Butcher, L. D. B., C Richard 2012). Neste âmbito, as modificações epigenéticas, ou seja, alterações na regulação da expressão genética (e não na sequência de DNA), como consequência de alterações na metilação do DNA ou da modificação pós-tradução das histonas, podem, por exemplo, silenciar os genes supressores de tumor (Starlard-Davenport, A. *et al.* 2010), e têm sido também associadas à transformação de células normais em células malignas (Butcher, L. D. B., C Richard 2012; Semi, K. *et al.* 2013).

## **I.2 Cancros Hormono-dependentes**

Os cancros hormono-dependentes, entre os quais se destacam alguns cancros da próstata e da mama, são dos principais tipos de cancro mais frequentes no mundo (Powles, T. J. *et al.* 1996; OMS 2013); (Henderson, B. E. and Feigelson, H. S. 2000) e pensa-se que podem partilhar o mesmo mecanismo de carcinogénese.

Para a normal atividade de uma célula, é necessário que ocorra uma integração entre as suas diversas vias metabólicas. Esse metabolismo é, na sua maioria, controlado pelas hormonas libertadas no sangue e que chegam aos órgãos alvo. Quando existe um descontrolo na secreção hormonal, pode ocorrer perda da homeostasia celular que é fundamental na manutenção do normal funcionamento dos tecidos, provocando diversas alterações, como por exemplo o cancro (Henderson, B. E. and Feigelson, H. S. 2000; Mesnil, M. *et al.* 2006). Neste tipo de cancros, as hormonas têm um papel importante como promotores ou indutores do cancro, uma vez que, tanto as exógenas como as endógenas, promovem a proliferação

celular, o que se traduz no aumento do número de divisões celulares e, portanto, na predisposição a alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento do tumor (Henderson, B. E. and Feigelson, H. S. 2000).

### 1.2.1 Cancro da Próstata

O cancro da Próstata (CP) tem sido apontado como a segunda causa de morte, por cancro nos homens, em Portugal e na Europa (Nunes, P. *et al.* 2010). Relativamente às taxas de incidência desta neoplasia verifica-se uma heterogeneidade a nível mundial (OMS 2013), o que pode revelar grandes diferenças interpopulacionais neste âmbito. O CP difere de outros cancros, no que diz respeito à prevalência latente, ou seja, o número de homens com CP excede, em muito, o número de homens diagnosticados com a doença e que morrem em consequência desta. Em Portugal, estima-se que surjam 4000 novos casos e que a mortalidade ronde os 1000 pacientes, por ano (Nunes, P. *et al.* 2010). Na etiologia do CP, parecem estar envolvidos diversos fatores, nomeadamente: hormonais, ambientais, genéticos, idade, etnia, e histórico familiar da doença do indivíduo. Fatores sexuais e nutricionais, como hábitos alimentares, podem, também, estar implicados no desenvolvimento do CP (Giovannucci, E. *et al.* 2007). No entanto, apesar da vasta pesquisa realizada nos últimos anos, os mecanismos de carcinogénese desta neoplasia permanecem por esclarecer quase inteiramente.

#### 1.2.1.1 Desenvolvimento do CP

A próstata é um órgão, exclusivamente, do sistema reprodutor masculino que se encontra na zona inferior da bexiga e está envolta numa cápsula que consiste num epitélio glandular envolvido num estroma fibromuscular. Este epitélio é constituído por duas camadas histologicamente distintas: camada basal e camada luminal. Acredita-se que a camada basal seja o compartimento proliferativo da próstata e é constituída por células epiteliais cubóides que aderem à membrana basal, na qual estão presentes células estaminais responsáveis pelo desenvolvimento de células epiteliais prostáticas. Por sua vez, a camada luminal é constituída por células luminais, células androgénio-dependentes, com actividade secretora e responsáveis pela produção do antigénio específico da próstata (PSA) (Long, R. M. *et al.* 2005). As células estaminais, presentes na camada basal, têm capacidade proliferativa ilimitada, são capazes de se auto-renovarem e ainda de se diferenciarem em células do epitélio glandular com capacidade proliferativa mais limitada (Huss, W. J. *et al.* 2004). Quando ocorrem perturbações no ambiente celular, o processo de diferenciação das células estaminais pode ser afetado e contribuir, para além de outros fatores, para o fenótipo maligno do CP (Kelly, K. and Yin, J. J. 2008).

Mais de 90% dos CPs, são adenocarcinomas que surgem a partir do epitélio glandular da próstata. Para melhor entendimento da carcinogénese de um tumor é necessário definir qual a célula em que teve origem. No entanto, no CP pode observar-se que as células cancerígenas possuem características das células luminais, como a secreção de PSA, e também características das células basais, apresentando um fenótipo resistente à apoptose (Kelly, K. and Yin, J. J. 2008). A possibilidade do CP ter origem numa única célula, que se comporta

como uma célula estaminal e dá origem a um tipo de cancro heterogéneo, pode ter implicações tanto para o tratamento, como para a compreensão do CP (Long, R. M. *et al.* 2005).

#### - Dependência Hormonal

Os androgénios são hormonas importantes para o crescimento da próstata, na medida **em** que são necessários para a proliferação e manutenção da camada secretora do epitélio, e a sua remoção ou ausência faz com que estas células sofram apoptose (Heinlein, C. A. and Chang, C. 2004). Os androgénios exercem a sua atividade através do recetor de androgénios (RA). O RA funciona como um fator de transcrição dependente do ligando e encontra-se presente nas células do epitélio da próstata, testículos, glândulas supra-renais, e sabe-se que a sua ativação é geralmente necessária no desenvolvimento do CP (Hess-Wilson, J. and Knudsen, K. 2006; Soifer, H. S. *et al.* 2012). A testosterona, produzida principalmente nas células de *Leydig*, nos testículos, e parcialmente na glândula supra-renal (sob a forma de percursores - DHEA e AD), é o principal androgénio masculino em circulação e os seus níveis são regulados por um mecanismo de *feedback* negativo estabelecido entre o eixo hipotálamo-hipófise/gónadas. A hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) hipotalâmica, estimula a hipófise anterior a produzir LH, e esta, por sua vez, atua nos testículos e estimula a síntese dos androgénios. Quando a testosterona em circulação contacta com o epitélio da próstata ou com as células do CP é convertida, por ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase, em dihidrotestosterona (DHT) (Heinlein, C. A. and Chang, C. 2004; Zhu, M.-L. and Kyprianou, N. 2010). A DHT é uma hormona que apresenta maior afinidade para o RA do que a própria testosterona. Após a ligação da DHT ao RA, ocorre ativação da via de sinalização intracelular, que culmina na ativação da transcrição de genes-alvo, envolvidos em importantes mecanismos de sobrevivência celular (Hess-Wilson, J. and Knudsen, K. 2006).

O desenvolvimento do CP é dependente da relação entre os níveis da proliferação celular e a taxa de apoptose nas células prostáticas, sendo os androgénios os principais reguladores desta relação, estimulando a proliferação celular e inibindo a apoptose. Desta forma, como habitualmente as células do CP, na sua fase inicial, dependem destas hormonas para o seu desenvolvimento, crescimento e sobrevivência, a sua proliferação pode ser suprimida pela terapia de privação de androgénios (TPA). Eventualmente, com o tempo, estas células tornam-se androgénio-independentes e surge a forma metástica da doença - um estado mais agressivo com muito mais difícil tratamento (Zhu, M.-L. and Kyprianou, N. 2010).

#### I.2.1.2 Tratamento do CP

A prostatectomia radical, remoção cirúrgica da próstata, e a radioterapia têm sido os principais tratamentos utilizados nos pacientes com CP aos quais se junta a terapia endócrina (Kelly, K. and Yin, J. J. 2008). No entanto, muitas vezes estes tratamentos falham, nomeadamente quando o CP prolifera independente de androgénios, ganhando uma forma mais agressiva e progredindo para outros tecidos, tornando-se mais difícil o seu tratamento. A TPA consiste na utilização de fármacos ou procedimentos cirúrgicos com o intuito de bloquear

o acesso de androgénios às células tumorais prostáticas. Esta abordagem terapêutica inclui todo o tipo de tratamentos que têm como objetivo principal controlar a carcinogénese por regulação hormonal.

#### - Terapia endócrina

A maioria das abordagens terapêuticas endócrinas no CP tem como alvo os RA, uma vez que estes são cruciais para o seu desenvolvimento. Os dois principais tipos de terapia abordados atualmente são: utilização de antiandrogénios e utilização de agonistas da LHRH. Os antiandrogénios competem com os androgénios, especificamente, ao nível dos RA na célula alvo, inibindo o crescimento da próstata no CP. Assim, antiandrogénios, como bicalutamida e flutamida, bloqueiam a ligação da Testosterona e da DHT ao RA e/ou alteram a atividade transcripcional do RA por lhe induzirem uma alteração conformacional (Soifer, H. S. *et al.* 2012). Os agonistas da LHRH têm uma ação ao nível da hipófise e regulam negativamente os recetores da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) na hipófise, o que leva à inibição da libertação da LH que, por sua vez, inibe a secreção, pelos testículos, de testosterona. Estas abordagens contribuem para a privação de androgénios e, por conseguinte, para a apoptose das células cancerígenas androgénio-dependentes.

Em adição ao uso de agonistas da LHRH, na fase inicial do CP, poderia recorrer-se também à orquiectomia para reduzir os níveis de testosterona produzida nos testículos. Todavia, com esta estratégia não se interfere na síntese de androgénios e seus precursores pelas glândulas supra-renais. Assim, uma estratégia eficaz passa pelo conjunto destas duas abordagens, orquiectomia com antiandrogénios, para bloquear a ação dos androgénios, produzidos fora dos testículos, nos seus recetores. Neste âmbito, o uso de inibidores do CYP17 - enzima importante na conversão de esteróides (como a progesterona) a androgénios tais como a testosterona, DHEA e AD, nos testículos e nas glândulas supra-renais, e nas células cancerígenas da próstata (Soifer, H. S. *et al.* 2012) ou administração de estrogénios, uma vez que o estradiol tem potencial antiandrogénio pois inibe a secreção de testosterona e de LH, são também abordagens relevantes para o tratamento do CP.

O tratamento do CP inicia-se geralmente com a TPA, a qual contribui para a remissão da doença, numa fase inicial, devido à natureza dependente de androgénios da maioria das células cancerígenas da próstata. Porém, observa-se, frequentemente, que vários pacientes evoluem para uma fase mais agressiva do cancro, em que surge hormono-resistência, ou seja, o cancro é androgénio-independente, surgindo metástases e deixa de haver resposta à TPA (Long, R. M. *et al.* 2005; Stanbrough, M. *et al.* 2006; Kelly, K. and Yin, J. J. 2008; Zhu, M.-L. and Kyprianou, N. 2010). Vários mecanismos podem estar envolvidos na progressão do CP androgénio-dependente para androgénio-independente. A síntese de androgénios intratumorais, a elevada expressão do RA devido à amplificação do seu gene (Stanbrough, M. *et al.* 2006) (que pode originar hipersensibilidade aos androgénios), o aumento da regulação da atividade do RA devido a fatores de crescimento, mutações no recetor (que contribuem

para a resistência à TPA) (Jiang, Y. *et al.* 2010), e alterações nos co-reguladores associados ao RA, são factores que podem estar implicados na progressão do CP.

Desta forma, o papel comprovado do RA na evolução do CP permite-nos concluir que o recurso a fármacos capazes de inibir ou bloquear as suas funções é um bom procedimento no combate ao CP. Os antiandrogénios, que desempenham o papel de antagonistas dos RA, podem ser esteróides ou não-esteróides, de acordo com a sua estrutura. Ambas as classes têm especificidade para o RA e inibem o crescimento das células cancerígenas da próstata. Os antiandrogénios não-esteróides, como a bicalutamida, flutamida e a nilutamida, são inibidores competitivos dos RA nos tecidos-alvo, e são os que mais se utilizam no tratamento do CP (Soifer, H. S. *et al.* 2012), por possuírem um potencial máximo de supressão de androgénios. Também se acredita que inibam a translocação do RA, do citoplasma para o núcleo, o que exerce um efeito antiproliferativo em pacientes com CP (Small, E. J. *et al.* 1997). O acetato de ciproterona (CPA) é um antiandrogénio esteróide que também bloqueia a ação do RA e inibe a ligação da DHT e a testosterona ao RA (Tammela, T. 2004).

### 1.2.2 Cancro da Mama

O cancro da Mama (CM) é uma das principais causas de morte da mulher, em todo o mundo (Mufudza, C. *et al.* 2012). Em Portugal, também se confirmam estes dados e, sendo assim, é o tipo de cancro mais comum e a principal causa de morte, por cancro, na população feminina (Sá, A. C. *et al.* 2012). Estima-se que, em Portugal, sejam diagnosticados 4500 novos casos por ano e que 1500 mulheres morram deste cancro (LPCC 2013) traduzindo-se num enorme impacto na sociedade, tanto ao nível socioeconómico como ao nível pessoal.

Vários estudos confirmam que existe uma variadíssima lista de fatores que contribuem para a hipótese de um individuo desenvolver CM. A alta incidência do CM no mundo pode ser influenciada por: idade, ambiente, genética, dieta, uso excessivo de álcool, história reprodutiva da mulher, entre outros. O estradiol, sendo uma hormona, é considerado como um importante fator de risco de CM (Brodie, A. *et al.* 2009) dado que está implicado na estimulação da divisão das células mamárias, no período de crescimento e desenvolvimento da mama, no crescimento de tumores responsivos a estrogénio e ainda exerce efeito sobre outras hormonas que também estimulam a divisão dessas células (Mufudza, C. *et al.* 2012). Se a mulher apresenta uma menarca precoce, ou menopausa tardia, que podem aumentar o número de ciclos ovulatórios, o risco de desenvolver CM é maior, pois os níveis de estrogénio em circulação estão elevados por mais tempo aumentam (Brodie, A. *et al.* 2009). Por sua vez, a amamentação prolongada ou a atividade física podem reduzir a frequência desses ciclos e diminuir os níveis de hormonas em circulação. A obesidade também é um importante factor contributivo, já que aumenta os níveis de estrogénios, que também são produzidos pelo tecido adiposo (Henderson, B. E. and Feigelson, H. S. 2000; Mufudza, C. *et al.* 2012). Algumas mutações no DNA, herdadas, podem aumentar o risco de incidência do CM em indivíduos da mesma família. Por exemplo, mutações nos genes do cancro da mama 1 e 2 (BRCA1 e BRCA2) - genes supressores do tumor - podem ser herdadas dos pais, e, uma vez alterados, podem

deixar de inibir o crescimento anormal das células e contribuir para o desenvolvimento de CM (Mufudza, C. *et al.* 2012). Por ser uma doença heterogênea a nível molecular e histológico, existem vários tipos de CM descritos na comunidade científica, com base no perfil de expressão genética, entre os quais os CM com presença ou ausência de recetor de estrogénio (RE) ou recetor de progesterona (RP) (Herschkowitz, J. I. *et al.* 2007).

### 1.2.2.1 Desenvolvimento do CM

A mama divide-se em vários lobos que, por sua vez, se dividem em lobos mais pequenos (lóbulo), nos quais estão presentes grupos de pequenas glândulas responsáveis pela produção de leite. O desenvolvimento do tecido mamário tem origem nas células estaminais mamárias. Destas surgem as células epiteliais luminais, que se dividem em ductais e alveolares, responsáveis pelo revestimento dos ductos. Nesta área encontram-se ainda as células mioepiteliais, que são células contrácteis localizadas na superfície basal do epitélio. Estas, por sua vez, estão ainda revestidas por fibroblastos, adipócitos e macrófagos, que constituem as células estromais. A glândula mamária é caracterizada por uma rede de ductos que terminam em pequenos aglomerados de ductos lobulares mais finos, nos quais, surgem a maioria dos CMs (Su, Y. *et al.* 2011).

O CM é um tumor maligno que se desenvolve a partir de células epiteliais do tecido mamário, que podem invadir tecidos vizinhos ou metastizar para diferentes áreas do corpo, quando ocorre falha no normal controlo sobre a morte e divisão dessas células (Delen, D. *et al.* 2005). Essas células respondem geralmente a sinais extracelulares, fatores de crescimento e hormonas circulantes, que podem contribuir para a proliferação desregulada e para a sua sobrevivência, resultando na sua malignidade.

#### 1.2.2.1.1 Influência hormonal no CM

Contrariamente a outros tipos de cancro, que têm vírus ou agentes químicos como iniciadores ou promotores da carcinogénese, os cancros hormono-dependentes, como o CM, têm um processo diferente de desenvolvimento. No CM não se conhece um iniciador específico, sendo as hormonas, endógenas ou exógenas, as responsáveis pela ocorrência de erros genéticos, principalmente porque estimulam a proliferação celular e o aumento das divisões celulares, os quais contribuem para a formação de mutações ao acaso. Neste tipo de cancros, o estímulo hormonal da divisão celular continua ao longo da progressão da carcinogénese e a sua interrupção poderá impedir a progressão tumoral (Henderson, B. *et al.* 1988). Várias hormonas, como o estradiol, a progesterona e a prolactina estão implicadas no crescimento e diferenciação das células mamárias, bem como em outras funções celulares do tecido e a sua influência no cancro da mama contribui para a designação de cancro hormono-dependente.

Apesar de ser produzido essencialmente nos ovários, o estradiol tem efeitos em vários tecidos e órgãos, tanto na mulher como no homem (Brodie, A. *et al.* 2009). Esta hormona é essencial para o normal desenvolvimento sexual e funcionamento dos ovários, do útero e da mama e regula, ainda, os ciclos menstruais da mulher. Aos estrogénios endógenos tem sido atribuído um grande papel no desenvolvimento do CM, uma vez que o risco de desenvolver CM é

essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação desta hormona (Mufudza, C. *et al.* 2012). O efeito dos estrogénios, como é típico das hormonas, é exercido através dos seus recetores específicos: ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  (Arnal, J.-F. *et al.* 2010). O ER- $\alpha$  é expresso no útero, fígado, rim e coração, sendo algumas vezes co-expresso com o ER- $\beta$  nas glândulas mamárias, tiroideas e supra-renais, assim como, também nos ossos e no cérebro. Já o ER- $\beta$  é expresso, especificamente, nos ovários, na próstata, nos pulmões, no trato gastrointestinal, na bexiga e no sistema nervoso central e as suas ações são, muitas vezes, opostas às mediadas pelo ER- $\alpha$  (Kawabata, W. *et al.* 2003). Estes recetores nucleares são produto de diferentes genes e estão dependentes da ligação a fatores de crescimento, que medeiam efeitos biológicos dos estrogénios, bem como dos antiestrogénios. Estes são essenciais para vários eventos fisiológicos, como por exemplo a puberdade e a gravidez. As respostas do ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  a agonistas e antagonistas diferem de acordo com as diferenças inerentes nos terminais-C dos domínios de ligação, dos recetores (Arnal, J.-F. *et al.* 2010). As células que possuem os recetores ER designam-se de células positivas para os recetores hormonais. Após a mulher entrar na menopausa, os ER e RP são expressos em níveis basais muito baixos nas células epiteliais mamárias normais. Por outro lado, cerca de 2/3 dos CM expressam níveis mais elevados de ER que o tecido mamário normal e metade desses cancros ER positivos expressam também RP (Harvey JM, C. G., Osborne CK, Alfred DC 1999; Karn, A. *et al.* 2010). Por conseguinte, pode sugerir-se que uma elevada recetividade a estrogénios neste tecido, está envolvida num maior risco de CM. O recetor ER- $\alpha$  está presente na maioria dos CM, em contraste com o ER- $\beta$ . Apesar disso, este segundo recetor pode também contribuir para a sensibilidade hormonal e resistência do CM aos tratamentos anticancerígenos. A função dos recetores hormonais nas neoplasias tem sido exaustivamente estudada e acredita-se que exista uma relação entre o número desses recetores e a capacidade proliferativa das células malignas. Desta forma, o complexo hormona-recetor pode então mediar a ativação de genes implicados na carcinogénese. Os genes responsáveis pelo efeito mitogénico dos estrogénios incluem, entre outros, os fatores de crescimento secretados, os recetores para esses fatores e a ciclina/cdk. A maioria destas proteínas reguladas pelo complexo acima referido são diferencialmente expressas nos tumores positivos para o ER e esse facto, muito provavelmente, poderá contribuir para o diferente potencial agressivo/metastático de cada tipo de CM (Karn, A. *et al.* 2010).

De realçar ainda que recorrer a antiestrogénios, que bloqueiem a ação negativa dos estrogénios nos ERs, inibindo o desenvolvimento e crescimento do tumor torna-se, sem dúvida, uma boa estratégia contra o CM (Mufudza, C. *et al.* 2012).

### 1.2.2.2 Tratamento do CM

Existem diferentes abordagens terapêuticas no tratamento do CM. As modalidades de tratamento são divididas em dois principais grupos, locais e sistémicos, baseado em como funcionam e onde actuam. A cirurgia e a radiação são exemplos de tratamentos locais, enquanto a quimioterapia e a terapia hormonal são terapias de tratamentos sistémicos. Em

muitos dos tratamentos de CM opta-se, contudo, por uma combinação de modalidades para aumentar o seu potencial de sucesso (Karn, A. *et al.* 2010). A escolha da terapia a usar depende do diagnóstico, incluindo a agressividade, o tamanho e a localização do tumor, e a condição médica do paciente. Em paralelo à radioterapia, os tratamentos hormonais endócrinos, principalmente com tamoxifeno (Ta) ou com inibidores da aromatase (IAs), são os mais comuns em mulheres com CM, uma vez que são, muitas vezes, terapia adjuvante para ajudar a reduzir o risco de reaparecimento do cancro após a cirurgia (Mufudza, C. *et al.* 2012). A terapia endócrina do cancro baseia-se em: privação de hormonas pela inibição da sua produção no tecido; utilização de antagonistas hormonais através de recurso a fármacos que exerçam essa função nos recetores hormonais; administração de elevadas concentrações de hormona que interfiram inibindo o crescimento do tumor, através de mecanismos diretos ou de *feedback* negativo. Esta abordagem terapêutica visa diminuir os níveis de estrogénios ou bloquear os seus efeitos no CM (Mufudza, C. *et al.* 2012). O *status* dos ERs no tumor (se são ER positivos ou negativos) também se torna importante para definir a terapia a adotar. A escolha e a eficácia do tratamento podem estar diretamente relacionadas com o número de recetores hormonais presentes no cancro, pois a maioria desses tumores, na fase inicial de crescimento, é responsiva aos fármacos anti-hormonais. Os tumores ER+, estão associados a prognósticos mais favoráveis do que os ER-, que metastizam rapidamente para o fígado, rins e cérebro (Karn, A. *et al.* 2010). Desta forma, pacientes com tumores que apresentem expressão de ER ou PR são elegíveis para terapia hormonal (Grann, V. R. *et al.* 2005).

#### 1.2.2.2.1 Recurso a antiestrogénios

A administração de antiestrogénios tem sido utilizada há mais de 30 anos como a terapia mais comum para o CM hormono-dependente (Haque, R. *et al.* 2012). Os antiestrogénios são responsáveis por bloquear a ação de estrogénios, competindo com estes na ligação aos ER. O Ta é um antiestrogénio que pertence à classe dos moduladores seletivos do recetor de estrogénio (SERM) e o seu mecanismo de ação envolve a inibição competitiva do ER, induzindo a morte celular programada (Singh, M. S. *et al.* 2011). O Ta é indicado como terapia hormonal adjuvante para pacientes que apresentem CM ER+, para mulheres em pré e pós menopausa com CM, e como prevenção de reaparecimento em mulheres que já foram operadas ao CM ou que apresentem elevado risco, uma vez que reduz o risco de recorrência do tumor em 50% (Singh, M. S. *et al.* 2011; Haque, R. *et al.* 2012). Apesar de a sua administração apresentar bons resultados, a resposta clínica ao Ta varia de paciente para paciente, e têm-se levantado algumas questões quanto à sua completa eficácia em inibir a progressão do tumor. Os SERMs são compostos que têm a capacidade de atuar como agonistas em alguns tecidos, como por exemplo: ossos, fígado e sistema cardiovascular; e como antagonistas noutros tecidos como: glândulas mamárias e cérebro. Neste sentido, acredita-se que o Ta possa ter um certo efeito agonista dos estrogénios, responsável por efeitos secundários, maléficos e benéficos, dependendo do tecido alvo (Perez, E. 2007). A preservação ou o aumento da densidade óssea têm sido apontadas como uma consequência benéfica do Ta, uma vez que, após a menopausa,

é comum o aparecimento de osteoporose como consequência da privação de estrogénio (Powles, T. J. *et al.* 1996). O parcial efeito agonista do Ta contribui também para o risco de cancro de endométrio e eventos tromboembólicos (Perez, E. 2007). Para além disso, a eficácia do Ta, como terapia adjuvante, é limitada a 5 anos de tratamento, podendo provocar quimioresistência pelo cancro. Tais factos têm levado à pesquisa de novas estratégias como alternativa a esta terapia. Neste contexto, compostos que interferem selectivamente na Aromatase e não tenham atividade estrogénica, são, por vezes, apontados como sendo mais eficazes e seguros que os antiestrogénios (Brodie, A. *et al.* 2009).

#### 1.2.2.2 Inibidores da Aromatase

As novas estratégias terapêuticas adjuvantes no tratamento do CM incluem o uso de IAs em substituição ou adição ao Tamoxifeno, uma vez que estão menos associados a efeitos adversos, pois não apresentam efeitos estrogénicos (Perez, E. 2007). A par da administração de antiestrogénios, a interferência hormonal nos ER, através da redução dos níveis de estrogénios circulantes é uma das estratégias da terapia endócrina no CM. Tal diminuição dos níveis de estrogénios torna-se possível, nomeadamente, inibindo a Aromatase, uma vez que, assim, estes inibidores bloqueiam a produção de estrogénios (Haque, R. *et al.* 2012).

Os estrogénios são sintetizados em vários tecidos humanos por intermédio da enzima aromatase. Esta enzima é pertencente à super família do citocromo P450, e é codificada pelo gene CYP19 (Brodie, A. *et al.* 2009). O complexo enzimático CYP19 está presente no retículo endoplasmático de células produtoras de estrogénio, como sejam as células da granulosa dos folículos ovários, e é responsável pela aromatização - conversão de androgénios (androstenediona (AD) e testosterona) a estrogénios (estrone e estradiol) através de três reações sucessivas. Apesar de os ovários serem a principal fonte de estrogénios circulantes, a aromatase está também presente nos tecidos periféricos, incluindo no tecido adiposo, fígado, músculos, cérebro e tecidos do CM. Tal facto é comprovado por existir síntese de estrogénios, mesmo após a menopausa, quando os ovários cessam a produção de estrogénio por perda dos seus folículos e, assim, a maioria dos estrogénios é proveniente da aromatização extra-gonadal (Brodie, A. *et al.* 2009). Como a aromatase está presente e é expressa tanto em tecidos periféricos, como na maioria dos casos de CM (Brodie, A. *et al.* 2001), os IAs podem inibir a produção de estrogénios nesses locais. Atualmente, existem três IAs utilizados na terapia hormonal: Aromasin (inibidor esteróide), anastrozole e letrozole (inibidores não-esteróides). Estes inibidores são compostos químicos que competem com o substrato para a ligação ao local ativo da enzima com o intuito de reduzir a quantidade de produto (estrogénios) e possuem diversas vantagens: são altamente específicos para a enzima, produzem inibição prolongada e exibem baixa toxicidade, conferindo aos IAs vantagens benéficas em relação ao uso de Tamoxifeno na terapia hormonal.

## I.3 - Potenciais novos agentes quimioterapêuticos

As terapias convencionais oncológicas, como para o CM e CP, incluindo as acima descritas apresentam efeitos secundários marcados e têm uma taxa de sucesso limitada, devido a fatores como a concentração insuficiente do agente químico no local de acção, elevada toxicidade sistémica e ausência de seletividade para a célula-alvo(Arkin, M. 2005). Todos estes fatores podem provocar reações adversas no paciente e, pior ainda, não se atingir a eficácia que se pretende, ou seja, a total remissão do cancro. Assim, é preminente o estudo e desenvolvimento de novos fármacos ou combinações que apresentem vantagens em relação a estes.

### I.3.1 Diosgenina

#### I.3.1.1 Origem e características gerais

A diosgenina, membro das sapogeninas esteróides, pode ser encontrada em diversas espécies vegetais, apresentando-se como um dos principais constituintes bioativos de várias plantas, nomeadamente, leguminosas comestíveis, bem como caracterizada nas sementes de *Trigonella foenum graecum Linn*, e nas raízes de inhame (*Dioscorea villosa Linn*). As cadeias de açúcar das saponinas esteróides presentes na *Dioscorea*, aquando do seu isolamento, sofrem hidrólise ácida, entre outras etapas, para produzir a diosgenina (Patel, K. *et al.* 2012).

A diosgenina, encontrada nas plantas na forma de saponina esteróide, parece ter funções biológicas importantes agindo como regulador de processos fisiológicos nas plantas e animais (Patel, K. *et al.* 2012). A sua estrutura química consiste numa aglicona hidrófoba esteróide contendo um grupo hidroxilo e uma ligação dupla nas posições C-3 e C-5, respetivamente e tem seis anéis na sua constituição: A, B, C e D (sistema ciclopentanofenantrenoperhidrofenantreno, característico dos esteróides) e anéis E e F. Estes anéis E (tetrahydrofurano) e F (tetrahidropirano) fundem-se na posição C-22, formando uma estrutura espiro (Figura 1). Nas saponinas, nomeadamente as moléculas precursoras da diosgenina, a natureza da aglicona e a porção oligossacarídica da molécula contribuem para as propriedades físico-químicas e biológicas (Vincken, J.-P. *et al.* 2007), que incluem, por vezes, uma vasta gama de propriedades benéficas para a saúde (Shi, J. *et al.* 2004). Assim, tem sido do maior interesse estudar as propriedades biológicas e farmacológicas da diosgenina.

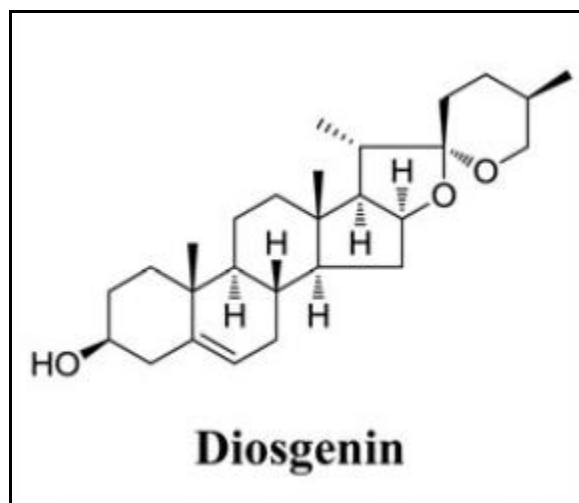


Figura 1: Estrutura química da Diosgenina (Patel, K. *et al.* 2012).

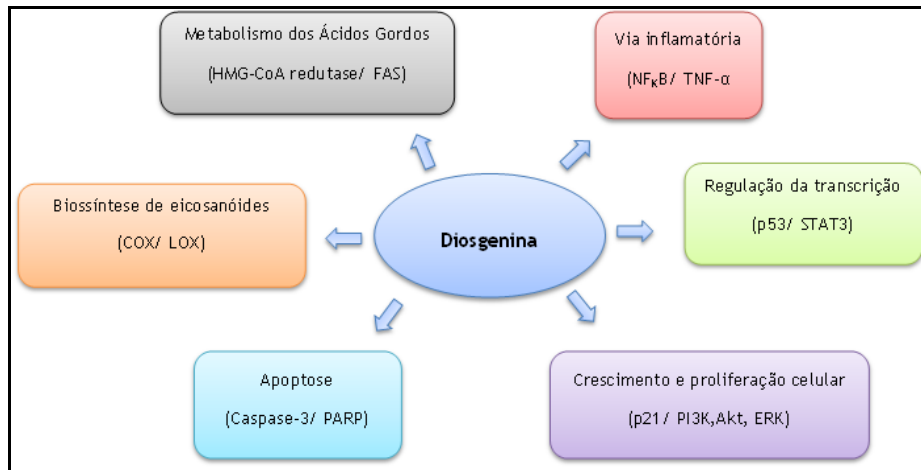
### I.3.1.2 Importância, actividade biológica e mecanismos de atuação

A diosgenina tem sido indicada como tendo potencialmente várias aplicações práticas, uma vez que apresenta um impressionante perfil farmacológico, podendo ser utilizada no tratamento de diferentes patologias. Esta sapogenina esteróide tem despertado atenções na indústria farmacêutica, pois, desde que foi descoberta, tem sido a principal fonte natural de hormonas esteróides (Ex: progesterona) e precursor na produção de esteróides sintéticos, como as pílulas contraceptivas. A diosgenina tem sido considerada segura já que não consegue ser sintetizada nem convertida, no organismo, em esteróides (Raju, J. and Bird, R. P. 2007). Além disso, estudos relevantes têm demonstrado que a diosgenina não causa toxicidade sistêmica, nem genotoxicidade e, possivelmente, também não tem atividade estrogénica muito significativa.

A diosgenina tem demonstrado actividade biológica contra várias doenças metabólicas (Temel, R. E. *et al.* 2009; Uemura, T. *et al.* 2010), bem como actividade antibacteriana, antiviral (Wang, Y.-J. *et al.* 2011), antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (Patel, K. *et al.* 2012), através de diferentes mecanismos/alvos (Figura 2).

De facto, a diosgenina parece ter um papel benéfico contra doenças metabólicas como hipercolesterolemia - reduz significativamente os níveis de colesterol total no plasma (Xu, L. *et al.* 2009), diabetes, obesidade, inflamação e cancro (Patel, K. *et al.* 2012). Em modelos experimentais de obesidade, demonstrou-se as propriedades hipoglicémicas e anti-inflamatórias da diosgenina, demonstrando-se que era responsável por diminuir os níveis plasmáticos e hepáticos dos triglicéridos e melhorar a homeostase da glicose, através da promoção de diferenciação de adipócitos e inibindo a inflamação no tecido adiposo (Patel, K. *et al.* 2012). Para além destas evidências, nos últimos anos, um elevado número de experiências têm sido realizadas para tentar entender a potencial eficácia clínica e aplicabilidade prática da diosgenina como um agente terapêutico contra diversos cancros. Esses ensaios, usando essencialmente modelos *invitro*, têm sugerido que a diosgenina suprime

o crescimento da célula cancerígena através de múltiplos eventos de sinalização celular associados, como a proliferação, a diferenciação, a apoptose, a inflamação e a oncogénese. A diosgenina inibe a proliferação e induz a apoptose numa variedade de linhas celulares tumorais humanas como as de cólon, de mama, de próstata e de fígado, assim como no osteossarcoma e na leucemia (Li, J. *et al.* 2005; Lee, Y.-C. *et al.* 2010; Li, F. *et al.* 2010; Chen, P. S. *et al.* 2011; Patel, K. *et al.* 2012).



**Figura 2:** Representação esquemática dos possíveis alvos moleculares e celulares da ação da diosgenina Adaptado de (Raju, J. and Rao, C. V. 2011).

No âmbito da acção antitumoral da diosgenina, uma vez que se sabe que a inflamação crónica pode ter um papel crucial na carcinogénese, a capacidade antiinflamatória que a diosgenina apresenta (Gao, M. *et al.* 2013) pode estar potencialmente envolvida na sua acção quimiopreventiva contra o cancro. As propriedades antiproliferativas e apoptóticas da diosgenina têm sido relacionadas, nomeadamente, com a sua capacidade de parar o ciclo celular, ativar o p53 - fator de libertação e indução de apoptose, e modular a atividade da caspase-3 (Corbiere, C. *et al.* 2003; Corbiere, C. *et al.* 2004), ou seja, o efeito anticancerígeno da diosgenina não envolve um único mecanismo, mas sim vários (Figura 2), e os alvos moleculares dependem, por vezes, do tipo de tumor e células alvo (Tabela 1).

**Tabela 1:** Atividade anticancerígena da diosgenina - estudos *in vitro*. PARP, poli polimerase (adenosina ribose-difosfato) - Adaptado de (Raju, J. and Rao, C. V. 2011).

Principais mecanismos de ação:	Estudos <i>in vitro</i> em:
Bloqueio da proliferação celular	Células do CM MCF-7; Células do CM MDA 231; Células 1547 osteossarcoma; Células cancro do cólon HT-29; Células cancro do cólon HCT-116; Células eritroleucemia HEL; Células leucemia K562;
Mecanismos pro-apoptóticos	
- Ativação da p53	Células do CM MCF-7; Células 1547 osteossarcoma; Células Hep-2 de laringocarcinoma; Células do melanoma M4Beau;
- Ativação da caspase 3	Células cancro do cólon HT-29; Células CM MDA 231; Células do cancro hepatocelular HCC; Células leucemia K562; Células eritroleucemia HEL;
- Aumento da expressão de p21	Células eritroleucemia HEL; Células cancro do cólon HCT-116;
- Clivagem do PARP	Células cancro do cólon HCT-116; Células do CM AU565; Células do cancro hepatocelular HCC; Células eritroleucemia HEL; Células leucemia K562;
Bloqueio nas fases do ciclo celular: Sub-G1 G1 G2/M	Células de leucemia mielogénica KBM-5; Células de osteossarcoma 1547; Células de eritroleucemia HEL;

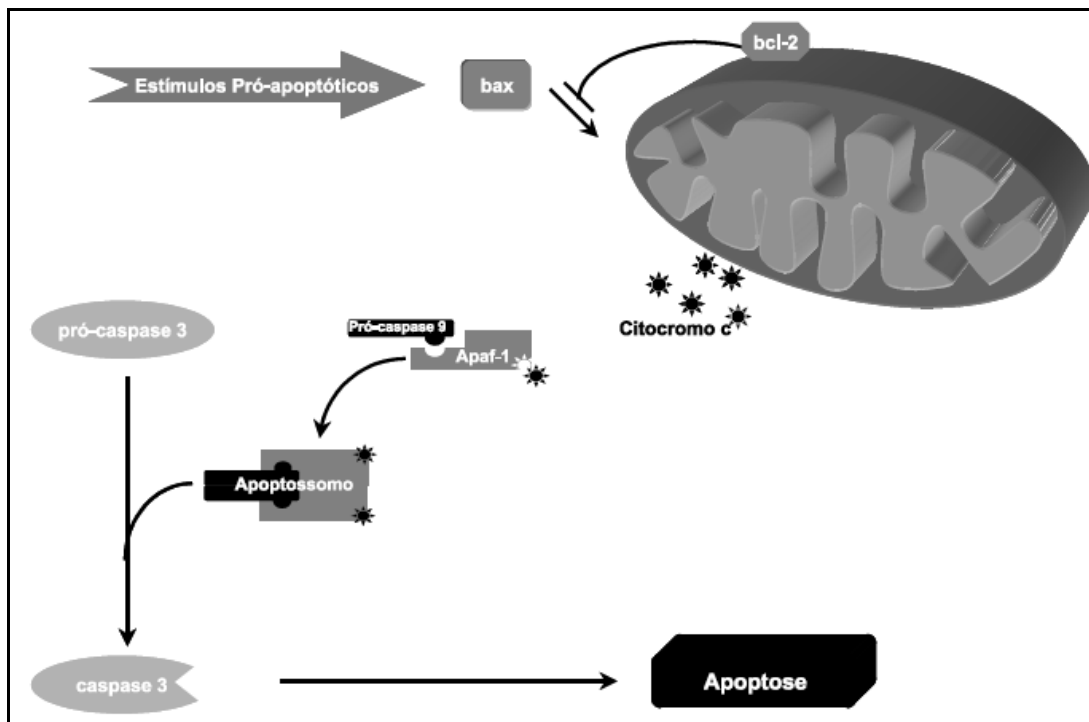
Esta substância, no que diz respeito ao estudo do CM, como em muitos outros tipos de cancro já mencionados, foi também já testada em ratos (Srinivasan, S. *et al.* 2009) observando-se novamente a inibição significativa do crescimento de tumores da mama, sem nenhuma

toxicidade evidente para qualquer outro órgão dos ratos. Várias pesquisas têm sido realizadas com intuito de avaliar melhor o papel da diosgenina na modulação do crescimento de vários tipos de cancro (Raju, J. and Rao, C. V. 2011).

Em suma, o principal mecanismo anticancerígeno da diosgenina passa pela perturbação do normal ciclo celular e pela indução da apoptose nas células cancerígenas (Lepage, C. *et al.* 2010). Para o normal funcionamento do ciclo celular, vários sinais são necessários para permitir a proliferação, sobrevivência, paragem do crescimento e morte celular programada das células normais. Quando as células adquirem um fenótipo maligno, perdem a capacidade de regular esses sinais, levando-as a proliferarem descontroladamente e à ausência de morte celular que, conseqüentemente, dá origem à carcinogénese (Foster, I. 2008).

O mecanismo de ação de vários fármacos anticancerígenos é baseado na sua capacidade em induzir a apoptose. A apoptose é um modo distinto de morte celular que é responsável pela eliminação de células em tecidos normais, mas, também, ocorre em determinados contextos patológicos (Foster, I. 2008). Este processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células (Kroemer, G. *et al.* 2008), como alterações no citoesqueleto, que induzem a contracção da célula, fragmentação do DNA e condensação da cromatina levando à formação de vesículas, sem perda da integridade da membrana (Amarante-Mendes, G. and Green, D. 1999). O processo de apoptose pode ser dividido em três fases distintas: de iniciação, efetora e de degradação. A primeira etapa - iniciação - compreende a sensibilização de um conjunto diversificado de moléculas reguladoras, que transmitem sinais de *stress*, como, por exemplo: stress oxidativo, erros no DNA, desequilíbrio iónico e presença de citocinas, para o centro das células aeróbicas - mais especificamente para a mitocôndria. A segunda etapa - efetora - é totalmente dependente da ativação de certos membros da família das caspases, que são responsáveis inteiramente pelos resultados morfológicos e bioquímicos da apoptose. Esta cascata de caspases é constituída pela ativação de proteases, nucleases e de outros intermediários. Na última etapa - degradação - dá-se o reconhecimento e eliminação de células apoptóticas, sem pôr em perigo qualquer outro segmento do seu microambiente. As células adquirem as seguintes características: diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, típicas desta etapa da apoptose (Amarante-Mendes, G. and Green, D. 1999; Kroemer, G. *et al.* 2008). A ativação da apoptose pode ser iniciada a partir de duas vias diferentes: via extrínseca (citoplasmática) em que é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de recetores de membrana da superfamília dos recetores de fatores de necrose tumoral que, por sua vez, é capaz de ativar a cascata de caspases (por exemplo: caspase-8 que ativará a caspase-3 (Shi, Y. 2002) ou via intrínseca (mitocondrial) na qual a privação de fatores de crescimento e lesões no DNA é fulcral para a sua ativação. A mitocôndria reage aos estímulos desencadeadores de morte celular e, por conseguinte, ocorre a sua permeabilização, um desacoplamento da cadeia respiratória e libertação do citocromo c bem como de moléculas pro-apoptóticas, do seu interior para o citosol. O citocromo c, já no citosol, forma um

complexo com a APAF-1 e a caspase-9 (chamado de apoptossoma) que incentiva a clivagem da pró-caspase-9, e conseqüente liberação da caspase-9 ativa que irá ativar a caspase-3 desencadeando a apoptose (Desagher, S. and Martinou, J.-C. 2000))



**Figura 3:** Via intrínseca da apoptose. Apaf-1- Fator de ativação de protease associada à apoptose. (Grivicich, I. *et al.* 2007).

Outro mecanismo de morte celular conhecido, é a necrose. Este tipo de mecanismo é conhecido como uma forma acidental de morte celular incontrolada e caracteriza-se: pela sua capacidade de lesar as células vizinhas; pela produção de inflamação local; aumento de volume celular; desorganização do citoplasma; desintegração da membrana plasmática e por conseqüência, ruptura celular. Inclui, entre outras, alterações mitocondriais, nos lisossomas, e alterações nucleares(Kroemer, G. *et al.* 2008).

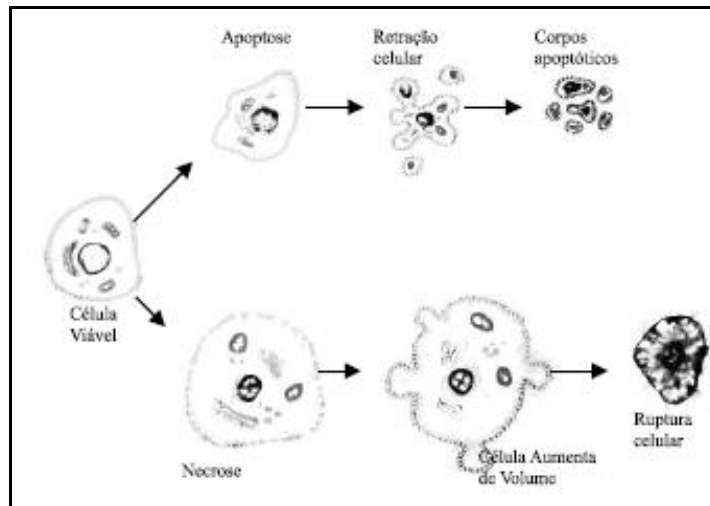


Figura 4: Características de morte celular: apoptose e necrose(Grivicich, I. *et al.* 2007).

### 1.3.1.3 Combinação da diosgenina com agentes anticancerígenos

Os esteróides podem desempenhar diversos efeitos biológicos sendo, muitas vezes, reguladores fisiológicos. Têm, também, e como já referido acima, um papel já estabelecido nos câncros hormono-dependentes. Como tal, a terapia convencional utilizada para o tratamento desse tipo de câncros, passa por uma terapia endócrina com possível inibição ou redução dos níveis séricos das hormonas, como os androgénios e os estrogénios, ou bloqueio dos recetores dessas hormonas. Foi evidenciado ao longo da introdução desta tese que a diosgenina tem sido bastante estudada, principalmente por experiências *invitro*, tentando elucidar as suas actividades biológicas, bem como o seu potencial mecanismo de ação na terapia do cancro e de outras doenças (Patel, K. *et al.* 2012). De facto, esta substância tem sido apontada como tendo potencial interesse farmacológico com propriedades anticancerígenas, cujos mecanismos de ação dependem da célula-alvo e passam habitualmente pela indução da apoptose e inibição do crescimento das células cancerígenas. No entanto, neste contexto, não são conhecidos muitos resultados de combinações da diosgenina com outros potenciais agentes anticancerígenos nem como terapia coadjuvante. Um exemplo neste âmbito incluiu o estudo da combinação da diosgenina com taxol, que é um conhecido fármaco utilizado no tratamento do cancro e atua como inibidor da divisão descontrolada das células(Menendez, J. A. *et al.* 2005).

Este facto, bem como as potencialidades da diosgenina em termos farmacoterapêuticos, levou-nos a questionar a sua combinação com outros agentes antitumorais como o tamoxifeno em CM ou a flutamida em CP.

O Tamoxifeno é um fármaco não esteróide, como já referido neste trabalho, vastamente utilizado no tratamento do CM, como terapia adjuvante. É um antiestrogénio, sobretudo em células mamárias, mas que, no entanto, pode também ter atividade agonista do ER em alguns tecidos. O seu mecanismo de ação no CM baseia-se no bloqueio da ligação dos estrogénios aos

seus recetores, impedindo a proliferação das células cancerígenas. A estrutura do Ta pode assumir a forma de isómeros *cis* e *trans*, sendo o isómero *trans* utilizado como agente antitumoral na maioria dos CM. A outra configuração possível do Ta, confere-lhe um carácter carcinogénico.

Para o tratamento do CP avançado, recorre-se frequentemente à Flutamida - um antiandrogénio, também não esteróide, que não apresenta atividade agonista hormonal e, portanto, atua a nível dos RA para bloquear a proliferação mediada por androgénios. Os seus metabolitos, principalmente a 2-hidroxi-flutamida, que apresenta uma afinidade maior que esta para o RA, atuam também inibindo a ligação da testosterona ou da DHT aos recetores nucleares e citoplasmáticos nas células alvo. No entanto, estudos demonstram uma pequena correlação entre a afinidade relativa de ligação do fármaco aos recetores androgénicos e a proliferação celular, o que sugere que o seu efeito benéfico, não se deve à interação direta com as células tumorais (Marona, H. R. N. *et al.* 2004).

Assim, optar por uma terapia que combine tanto os antiestrogénios ou antiandrogénios, que têm essencialmente atividade antiproliferativa em células cancerígenas, com substâncias como a diosgenina, cujo potencial anticancerígeno a nível da indução da apoptose, efeitos citotóxicos e antiproliferativos tem sido fortemente provado, pode constituir uma possibilidade para enfrentar o comportamento altamente agressivo que muitos cancros apresentam, com a vantagem de poder reduzir os efeitos secundários adversos e a pouca seletividade de outros tratamentos tradicionais em monoterapia.

## II. Objetivos

Tendo como ponto de partida os resultados dos trabalhos realizados pelo grupo de investigação no qual este projeto se insere, que evidenciaram o potencial efeito citotóxico da diosgenina nas células do CM e do CP, bem como a sua possível combinação com outros agentes anticancerígenos, o objetivo do presente trabalho é avaliar/determinar a acção de potenciais combinações de agentes quimioterapêuticos - nomeadamente os compostos Diosgenina, Tamoxifeno e Flutamida - em duas linhas celulares, MCF-7 (linha celular de cancro mamário humano) e LNCaP (células humanas de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios), visando a sua possível contribuição/aplicação na terapia do cancro da mama e da próstata.

Para tal, efectuaram-se:

- Ensaios de viabilidade celular para determinar a atividade citotóxica dessas combinações de compostos sobre a proliferação/viabilidade das células em estudo;
- Para as concentrações mais promissoras, estudos biológicos para contribuir para o conhecimento do seu mecanismo de ação, para tentar identificar possíveis mecanismos de morte celular e avaliar a taxa de morte celular.



# III. Parte experimental

## III.1 Material

### III.1.1 Compostos, soluções e meios de cultura

- Meio de cultura RPMI-1640, Sigma Aldrich;
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Sigma Aldrich;
- Soro bovino fetal (FBS), Biochrom AG, Portugal);
- Antibiótico Ab (Solução de estreptomicina e penicilina e anfotericina-B), Sigma Aldrich;
- Antibiótico Sp (Solução de estreptomicina e penicilina), Sigma Aldrich;
- 0,025 % Tripsina em PBS/EDTA (1 g de tripsina para 666 ml de PBS/EDTA);
- Corante azul de triptano (0,4 %), Merck;
- Tampão fosfato salino (PBS) [90 % água MilliQ e 10 % de PBS 10x];
- Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), Sigma Aldrich ;
- Tampão glicina Sörensen [Solução de 0,1 M glicina, 0,1 M NaCl com pH ajustado a 10,5 com 0,1 M NaOH];
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich ;
- Etanol absoluto, Merck;
- Solução preparada de Etanol a 70%;
- Peróxido de Hidrogénio [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%], Sigma Aldrich;
- Laranja de Acridina, Sigma Aldrich;
- Solução de Iodeto de Propídio (Sigma Aldrich)/Azida a 0,1%;
- Solução de Laranja de Acridina (AO)/Iodeto de Propídio(IP)[0,1mg de AO e 0,1mg de IP/ml em PBS)];
- RNase, Sigma Aldrich;
- PBS/BSA 0.5% (0,5g de BSA/100ml PBS);
- Solução de Iodeto de Propídio/ (PBS/BSA).

### III.1.2 Instrumentação

- Microscópio Olympus CK 40;
- Estufa NUAIRE DHD Autoflow CO<sub>2</sub> Air-Jacketed incubator;
- Centrífuga Sigma 3K18C Bioblockscientific;
- Centrífuga Mikro 20 Hettich;
- Leitor espectrofotométrico de microplacas Anthos 2020;
- Câmara de fluxo laminar NUAIRE Class II;
- Microscópio óptico, Olympus;
- Microscópio de fluorescência AXIOImagerA1, Zeiss;
- Citómetro BD FACS Calibur;

## III.2 Linhas celulares

Para a realização deste estudo utilizaram-se duas linhas celulares: células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7) e células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP). Desde que se criem condições necessárias para o seu

crescimento e proliferação, ambas as linhas celulares têm a capacidade de se multiplicarem indefinidamente.

### III.2.1 Células MCF-7

As células do CM em estudo têm o acrônimo de MCF-7, Michigan Cancer Foundation-7, a que diz respeito o local onde foi feito pela primeira vez o seu isolamento. São células epiteliais obtidas a partir de efusão pleural de uma mulher que apresentava adenocarcinoma mamário metastático. São bem conhecidas pelo seu crescimento em monocamada, pela sua capacidade de aderência e resposta a estrogénios através da expressão de receptores de estrogénios e, portanto, as células são positivas para ERs citoplasmáticos (Wang, T. T. and Phang, J. M. 1995). Por esse motivo, esta linha celular é amplamente usada em estudos do cancro da mama e estudos de mecanismos de acção hormonal. Para este trabalho foram utilizadas células MCF-7 (Figura 5) nas passagens: 11 a 40.

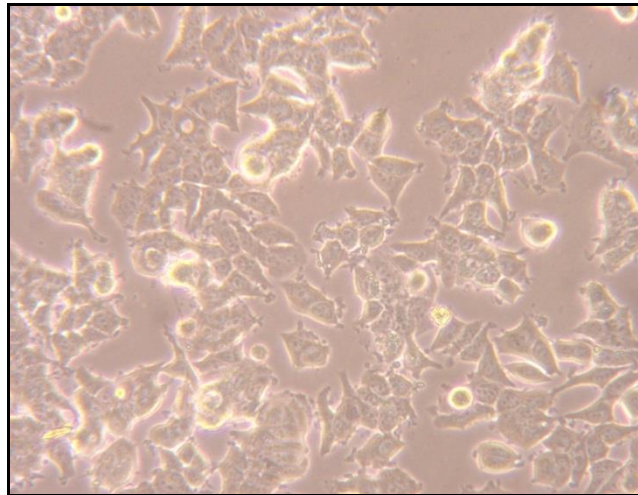


Figura 5: Células MCF-7 Passagem 29 (20X).

### III.2.2 Células LNCaP

As células LNCaP, *Lymph node carcinoma of the prostate*, utilizadas no presente estudo, são uma linha celular humana 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 também células epiteliais aderentes que tanto podem crescer de forma isolada ou em agregados (Horoszewicz, J. S. *et al.* 1983). Para o presente estudo foram utilizadas células LNCaP (Figura 6) nas passagens: 22 a 25.

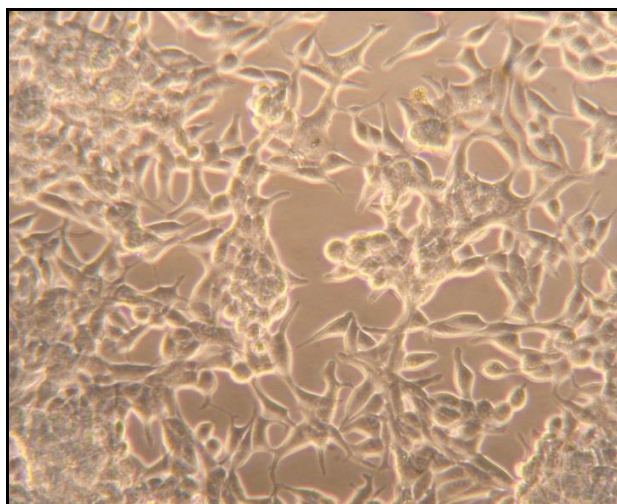


Figura 6: Células LNCaP Passagem 23 (20X).

### III.3 Manutenção das linhas celulares

Na manutenção das linhas celulares é importantíssimo trabalhar em condições de assepsia e, portanto, recorreu-se às salas de cultura celular para desenvolver os ensaios celulares onde se encontram, essencialmente: câmaras de fluxo laminar vertical (Nuair, classe II), uma estufa de CO<sub>2</sub> (NUAIRE DHD Autoflow) e um microscópio ótico (Olympus CK 40). A câmara permite trabalhar em condições de esterilidade, quando usada de forma adequada e o operador tem todos os cuidados necessários. As células, para além da necessidade de um suporte sólido para crescerem e proliferarem, são sensíveis a vários fatores, como a temperatura, a pressão e a composição do ar e composição do meio, incluindo o seu pH. Portanto, precisam geralmente de ser incubadas numa estufa com 5% de CO<sub>2</sub> que contribua para um ambiente constante em termos de temperatura e humidade, de modo a que a variabilidade desses fatores seja nula ou quase nula e permita o seu crescimento adequado. A presença de um microscópio ótico permitiu ir controlando a confluência das células nos frascos de cultura e o possível aparecimento de contaminações. É sempre necessário o uso de bata e luvas e desinfetar as mãos com etanol a 70% quando se manuseia células e todos os materiais que estejam em contato com as mesmas. Além disso, os frascos de cultura celulares e todo o material necessário, antes de entrarem na câmara de fluxo laminar devem ser pulverizados com etanol a 70%. Da mesma forma, quando os materiais adquiridos não estão estéreis devem passar pela autoclave, que os esteriliza usando calor húmido e pressão. Após a sua utilização, todos os materiais como: pontas, pipetas volumétricas, falcons e frascos devem ser desinfetados com lixívia e adequadamente descartados.

#### III.3.1 Preparação de meios de cultura

Como descrito na bibliografia, cada linha celular tem um meio de cultura mais apropriado. O meio de cultura deve ser suplementado, com aminoácidos, soro, antibióticos, entre outros,

para que se obtenha um bom crescimento e diferenciação celular. As linhas celulares neste estudo variam no tipo de meio utilizado sendo que:

- As células LNCaP foram cultivadas com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de FBS e com 1% de antibiótico Sp (10,000 unidades/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina).
- As células MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de antibiótico/antimicótico Ab (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B).

Após a dissolução dos componentes dos meios de cultura, efectuou-se a sua esterilização por filtração sob vácuo na câmara de fluxo laminar.

### III.3.2 Descongelamento

Para se poder utilizar as células em estudo, que estavam armazenadas em bancos de células, em azoto líquido, foi necessário recorrer ao seu descongelamento. Para tal, descongelou-se à temperatura ambiente as alíquotas, com as células em meio de crioconservação. Entretanto, aqueceram-se, aproximadamente, 20 ml de meio de cultura celular e adicionou-se 3ml a cada falcon contendo o conteúdo da alíquota de crioconservação. Seguidamente, levou-se à centrífuga a 1000 rpm, durante 8 minutos. No seguimento, descartou-se o sobrenadante, de forma a remover todo o meio de crioconservação, contendo DMSO. O pellet obtido foi ressuscitado no meio de cultura apropriado. Por fim, transferiu-se a suspensão celular para um frasco de cultura de 75cm<sup>2</sup> (*Orange scientific*), acrescentou-se meio de cultura correspondente ao tipo de células (15ml para cada frasco) e foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, na estufa de modo a permitir o seu crescimento. A cada 2-3 dias recorreu-se à substituição do meio e quando as células atingiram a confluência máxima procedeu-se à sua tripsinização e posterior divisão para novos frascos de cultura.

### III.3.3 Tripsinização

Quando as células atingiram a fase exponencial de crescimento, ou seja, cerca de 90% de confluência, recorreu-se à sua tripsinização. A avaliação da confluência das células foi sempre efectuada através de observação microscópica.

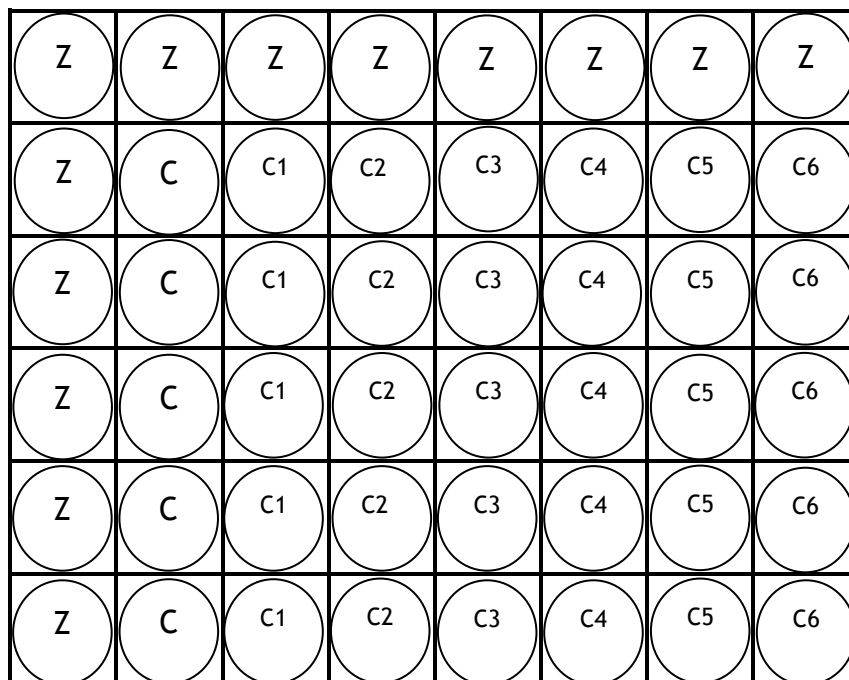
O procedimento de tripsinização de células consistiu na aspiração com vácuo do meio de cultura, que se encontra no frasco, seguida da lavagem das células com tampão fosfato salino (PBS) (cerca de 10ml para um frasco de 75ml), e após a aspiração deste, fez-se a adição de cerca de 10ml de tripsina, que contactou com as células na incubadora, por um período de 5 minutos, para que as células na base do frasco se soltem e se dissociem; após a observação ao microscópio para confirmar a suspensão celular, efectuou-se a neutralização da tripsina com meio de cultura suplementado com FBS aquecido previamente a 37°C e fez-se a transferência da suspensão celular para um falcon e centrifugação da mesma a 1000rpm durante 8 minutos. Após a aspiração do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* formado com meio de cultura completo, efectuou-se a distribuição da suspensão celular, para expandir as células, em novos frascos de cultura ou, no caso da avaliação dos compostos em estudo na proliferação celular,

preparou-se o volume pretendido com a concentração adequada de células para semear em placas *multiwells*.

### III.3.4 Contagem e sementeira de células

Ao fazer-se um novo ensaio celular é necessário contabilizar-se o número de células para aferir a concentração adequada das mesmas, a semear em cada poceto. Para tal, após o procedimento de tripsinização, no qual o *pellet* resultante é ressuspensionado em 5-6ml de meio completo, retiram-se 10µl da suspensão celular e adicionam-se com 10µl de solução de azul tripano num tubo *ependorf*. Esta combinação de 20µl é transferida para uma câmara de *Neubauer* e contabiliza-se o número de células em cada quadrante. Para uma contagem correta, ressuspendeu-se muito bem a suspensão celular de modo a evitar a sedimentação ou formação de aglomerados por parte das células. Para a contagem recorreu-se a um contador e ao microscópio ótico (ampliação 40x). Para o cálculo do volume a retirar da suspensão celular para posterior expansão ou sementeira, é necessário antes calcular-se a média de células existente por quadrante e multiplicar-se o valor obtido por 2 (devido à diluição das células pela adição da solução de azul de tripano) e aplicar-se a fórmula de Neubauer para saber a concentração inicial de células para de seguida fazer a diluição adequada.

No presente estudo, para cada ensaio de proliferação celular, foram preparadas placas *multiwells* de 48 poços e usou-se a densidade celular de  $2 \times 10^4$  células/ml. A cada poceto adicionou-se 250µl de suspensão celular, à excepção dos pocetos definidos como zeros aos quais foram adicionados 250µl apenas de meio completo (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema representativo da sementeira em placas de 48 *multiwells* quando se estudou cada composto isoladamente; Z= zeros; C= controlo (apenas suspensão celular), aos restantes poços foram adicionados também 250µl da suspensão celular e, posteriormente, diferentes concentrações dos compostos.

As células já semeadas em cada poceto mantiveram-se em meio de cultura apropriado e na incubadora por 48 horas permitindo, deste modo, a aderência e proliferação celular adequadas.

No ensaio referido em III.5.3 a densidade celular usada foi também  $2 \times 10^4$  células/ml e a incubação com os compostos decorreu igualmente durante 48h, mas no ensaio III.5.4, densidade celular usada foi de  $10 \times 10^4$ /ml e a incubação ocorreu por um período de 24 horas.

## III.4 Compostos testados nas linhas celulares

### III.4.1 Diosgenina

Aquando da preparação da solução inicial de Diosgenina, diluiu-se a mesma em 2ml de solvente, etanol absoluto, para que se atingisse uma concentração final de  $10^{-2}M$ . A partir da solução mãe foram preparadas soluções com concentrações de  $0,01\mu M$ ;  $0,1\mu M$ ;  $1\mu M$ ;  $10\mu M$ ;  $50\mu M$  e  $100\mu M$ , nos respectivos meios de cultura, requeridas para o trabalho experimental.

### III.4.2 Tamoxifeno

Na preparação da solução de Tamoxifeno de  $10^{-2}M$  dissolveu-se o fármaco em etanol absoluto. Desta solução prepararam-se soluções de concentrações  $0,1\mu M$ ;  $1\mu M$ ;  $10\mu M$ ;  $15\mu M$ ;  $20\mu M$  e  $30\mu M$ , no respectivo meio de cultura, necessárias para este estudo.

### III.4.3 Flutamida

Para a preparação da solução de Flutamida de  $10^{-2}M$  misturou-se o fármaco em etanol absoluto. Partindo desta solução formaram-se soluções de concentrações de  $0,01\mu M$ ;  $0,1\mu M$ ;  $1\mu M$ ;  $10\mu M$ ;  $50\mu M$  e  $100\mu M$ , no respectivo meio de cultura, requeridas para este trabalho.

### III.4.4 Combinações de compostos

Foram ainda realizados ensaios onde se testou uma gama de concentrações combinadas do composto Diosgenina com os compostos Tamoxifeno e Flutamida nas células MCF-7 e LNCaP, respetivamente. Para estes ensaios, preparam-se também soluções de concentração de Diosgenina a  $1\mu M$ ,  $10\mu M$  e  $50\mu M$ , Tamoxifeno a  $10\mu M$  e  $20\mu M$  e Flutamida s  $10\mu M$  e  $100\mu M$ , a partir das suas soluções-mãe.

#### III.4.4.1 Diosgenina e Tamoxifeno

A partir das respectivas soluções-mãe foram preparadas ainda soluções com concentrações de: Diosgenina  $10\mu M$  e Tamoxifeno  $10\mu M$ ; Diosgenina  $10\mu M$  e Tamoxifeno  $20\mu M$ ; Diosgenina  $50\mu M$  e Tamoxifeno  $10\mu M$ ; Diosgenina  $50\mu M$  e Tamoxifeno  $20\mu M$ , em meio DMEM completo para as células MCF-7. A cada gama de concentrações correspondem 5 poços aos quais se adicionaram  $250 \mu l$ /poço de cada solução preparada. O esquema de aplicação está representado na figura 8.

C	C	C	C	C	Z	Z	Z
D10	D50	T10	T20	D10T 10	D10T 20	D50T 10	D50T 20
D10	D50	T10	T20	D10T 10	D10T 20	D50T 10	D50T 20
D10	D50	T10	T20	D10T 10	D10T 20	D50T 10	D50T 20
D10	D50	T10	T20	D10T 10	D10T 20	D50T 10	D50T 20
D10	D50	T10	T20	D10T 10	D10T 20	D50T 10	D50T 20

**Figura 8:** Esquema representativo da distribuição dos compostos Diosgenina (D10= Diosgenina 10 $\mu$ M; D50= Diosgenina 50 $\mu$ M) e Tamoxifeno (T10= Tamoxifeno 10 $\mu$ M; T20 $\mu$ M= Tamoxifeno 20 $\mu$ M) e suas combinações (D10T10=Diosgenina 10 $\mu$ M com Tamoxifeno 10 $\mu$ M; D10T20= Diosgenina 10 $\mu$ M com Tamoxifeno 20 $\mu$ M; D50T10=Diosgenina 50 $\mu$ M com Tamoxifeno 10 $\mu$ M; D50T20= Diosgenina 50 $\mu$ M com Tamoxifeno 20 $\mu$ M). C= Controlo; Z=Zeros.

#### III.4.4.2 Diosgenina e Flutamida

A partir das respectivas soluções-mãe foram preparadas soluções com concentrações de: Diosgenina 1 $\mu$ M e Flutamida 10 $\mu$ M; Diosgenina 1 $\mu$ M e Flutamida 100 $\mu$ M; Diosgenina 50 $\mu$ M e Flutamida 10 $\mu$ M; Diosgenina 50 $\mu$ M e Flutamida 100 $\mu$ M, em meio RPMI completo para as células LNCaP. A cada gama de concentrações correspondem 5 poços aos quais se adicionaram 250  $\mu$ l/poço de cada solução preparada. O esquema de aplicação está representado na figura 9.

C	C	C	C	C	Z	Z	Z
D1	D50	F10	F100	D1 F10	D50F 10	D50F 10	D50 F100
D1	D50	F10	F100	D1 F10	D50F 10	D50F 10	D50F 100
D1	D50	F10	F100	D1 F10	D50F 10	D50F 10	D50F 100
D1	D50	F10	F100	D1 F10	D50F 10	D50F 10	D50F 100
D1	D50	F10	F100	D1 F10	D50F 10	D50F 10	D50F 100

**Figura 9:** Esquema representativo da distribuição dos compostos Diosgenina (D1= Diosgenina 1 $\mu$ M; D50= Diosgenina 50 $\mu$ M) e Flutamida (F10= Flutamida 10 $\mu$ M; F100 $\mu$ M= Flutamida 100 $\mu$ M) e suas combinações (D1F10= Diosgenina 1 $\mu$ M com Flutamida 10 $\mu$ M; D1F100= Diosgenina 1 $\mu$ M com Flutamida 100 $\mu$ M; D50F10= Diosgenina 50 $\mu$ M com Flutamida 10 $\mu$ M; D50F100= Diosgenina 50 $\mu$ M com Flutamida 100 $\mu$ M). C= Controlo; Z=Zeros.

### III.5 Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular

#### III.5.1 Procedimento geral

Após as 48 horas de incubação das placas multiwells necessárias para o crescimento celular, adicionou-se os compostos em estudo nas concentrações desejadas, e acima referidas, que permaneceram em contato com as células no período de tempo adequado. Em todos os ensaios realizados, a concentração final de etanol (solvente orgânico) foi inferior a 1% em cada poço, e de acordo com estudos anteriores, esta concentração não tem qualquer efeito na viabilidade celular.

#### III.5.2 Ensaio de proliferação celular (MTT)

O ensaio de proliferação celular (MTT) permite interpretar o efeito citotóxico induzido no metabolismo celular (Freshney, R. I. 2005) por um composto/fármaco e, portanto, recorreu-se a este ensaio para o estudo do efeito dos compostos de interesse nas células MCF-7 e LNCaP.

O princípio do ensaio MTT é a redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, Portugal) (de cor amarela, solúvel em água) a cristais de formazano (de cor azul, insolúvel em água), pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, existente no interior de células viáveis (Mosmann, T. 1983). O ensaio MTT

depende do número de células presentes e da actividade mitocondrial celular sendo a quantidade de formazano produzida proporcional ao número de células viáveis.

Após o tratamento com os compostos de interesse e durante 48h, os sobrenadantes foram aspirados e após lavagem com PBS, acrescentou-se, na ausência de luz, a solução de MTT (5 mg/ml em PBS), que permaneceu durante um período de 4 horas em contato com as células, numa atmosfera de 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Findo este tempo de incubação, aspirou-se o conteúdo existente nos poços das placas e adicionou-se DMSO (200µl) e tampão glicina (25µl) em cada poço. O DMSO permite a solubilização dos cristais de formazano e o tampão glicina permite estabilizar a cor obtida. Seguidamente, o conteúdo das placas (225µl em cada poço) foi transferido para microplacas de 96 wells adequadas para um leitor espectrofotométrico (Anthos 2020) e quantificou-se a absorvância a 570nm. Obtidos os valores, as placas foram posteriormente descartadas.

Para todas as concentrações dos compostos testados, foram realizados ensaios em triplicado de modo a efetuar uma análise estatística (n=15).

### III.5.3 Microscopia de fluorescência - Método de coloração dupla de Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio

A morte celular das células MCF-7 e LNCaP foi quantificada recorrendo ao Laranja de Acridina (AO) e ao Iodeto de Propídio (IP) como sondas fluorescentes, através de microscopia de fluorescência. Recorreu-se a este método para tentar identificar a possível mecanismo de morte celular provocado pelos compostos em estudo.

O método utilizado foi adaptado de (Gomes Cornélio, A. L. *et al.* 2011; Alabsi, A. M. *et al.* 2012). Às células, semeadas em placas de 6 wells por um período de 48 horas para permitir a sua aderência/crescimento, foi removido o meio e substituído pelos compostos diluídos num novo meio e suas combinações em diferentes concentrações (8 condições), para cada tipo de célula foram:

- Diosgenina 10µM; Diosgenina 50µM; Tamoxifeno 10µM; Tamoxifeno 20µM; Diosgenina 10µM + Tamoxifeno 10µM; Diosgenina 10µM + Tamoxifeno 20µM; Diosgenina 50µM + Tamoxifeno 10µM e Diosgenina 50µM + Tamoxifeno 20µM, para células MCF-7;
- Diosgenina 1µM; Diosgenina 50µM; Flutamida 10µM; Flutamida 100µM; Diosgenina 1µM + Flutamida 10µM; Diosgenina 1µM + Flutamida 100µM; Diosgenina 50µM + Flutamida 10µM e Diosgenina 50µM + Flutamida 100µM, para células LNCaP;

Para avaliar a frequência do mecanismo de morte celular, um dos poços foi tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mmol/L), agente oxidante conhecido indutor da apoptose (Gomes Cornélio, A. L. *et al.* 2011), por 1 hora (controlo positivo para apoptose). As células presentes num poço não receberam qualquer tratamento a fim de serem usadas como controlo. Após as 48 horas de exposição aos compostos, estes foram aspirados. Cada poço foi individualmente lavado com PBS e tripsinizado de seguida. Posteriormente, adicionou-se meio completo para inativar a

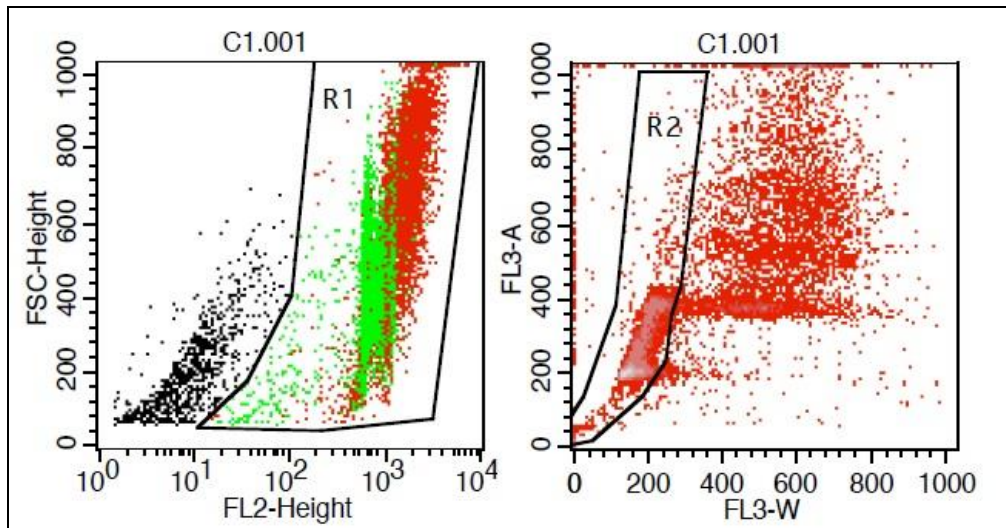
tripsina e todo o conteúdo do poço foi transferido para um falcon, para centrifugar (8 minutos a 1000rpm). Aspirou-se de seguida o sobrenadante e lavou-se com PBS para nova centrifugação. O *pellet* obtido foi bem ressuspensionado em 20µL de PBS. À suspensão celular foi adicionado 5µL da solução AO/IP (igual volume dissolvido em PBS - 0,1mg/ml) e observada ao microscópio de fluorescência num espaço de tempo inferior a 30 minutos (Filtros: Verde - excitação BP 470/40 e emissão BP 525/50; Vermelho - excitação BP 546/12 e emissão BP 575/640, objetivas 10X e 40X). O AO penetra tanto nas células vivas como nas mortas e o IP apenas nas células com a membrana celular alterada (Gomes Cornélio, A. L. *et al.* 2011). As imagens do controlo e das células tratadas foram guardadas através de uma máquina fotográfica acoplada ao microscópio. As células viáveis (emitem fluorescência verde) e as células mortas (emitem fluorescência vermelha) foram quantificadas numa população de n=100/condição/linha celular através do *Software* AxioVision versão 4.8.

### III.5.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método vastamente utilizado para avaliação da distribuição das células entre diferentes fases do ciclo celular.

Para a realização deste procedimento, as células MCF-7 foram semeadas em placas de 6wells com uma densidade celular de  $10 \times 10^4$ /ml, e mantidas na incubadora por um período de 24 horas. De seguida, foram incubadas com os devidos compostos e suas combinações de concentrações (como descrito no passo anterior), por 24 horas. Dois dos poços não receberam qualquer tratamento a fim de as células serem usadas como controlo. Findo esse tempo, o sobrenadante de cada poço foi aspirado, fez-se lavagem das células com PBS e a sua colheita com tripsina (800µl/poço durante 5 minutos) para um falcon de 15ml. Lavou-se novamente o poço com 1ml de PBS para garantir a total recolha de células. Centrifugou-se a 1290rpm durante 5 minutos. Aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 450µL da solução preparada de PBS/BSA. De seguida, fixaram-se as células com 2ml de etanol a 70% (adicionado gota a gota sob vortex) em gelo. Aguardou-se cerca de 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 10 ml de PBS a cada falcon e centrifugou-se. Rejeitou-se o sobrenadante. Lavou-se uma segunda vez com PBS e as células foram centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o *pellet* em 250µl da solução de IP preparada em PBS/BSA (0,05%). Transferiu-se o conteúdo de cada falcon para cada tubo de citometria, aos quais foram adicionados previamente 6µl de RNase e foram mantidos, pelo menos, 15 minutos no escuro. Procedeu-se à aquisição, no citómetro a baixa velocidade de fluxo e a menos de 400 eventos/s, um total aproximado de 10.000 eventos. A análise foi feita através do *software* BD Cell Quest™Pro, versão 5.1.1.

Para a análise da distribuição do ciclo celular foi necessário definir duas regiões Figura 10, pelo *software*. Criou-se uma região, R1, em que se exclui os eventos sem marcação, ou seja, uma região na qual só se inclui os eventos (células) que consideramos ter marcação de iodeto de Propídio e uma outra região, R2, para excluir os agregados e incluir apenas os singletos e *Debris* (fragmentos celulares com DNA) para análise.



**Figura 10:** Regiões definidas para análise da distribuição do ciclo celular, por citometria de fluxo. R1: Região com eventos marcados; R2: Região de singletos e *debris*.

### III.6 Análise Estatística

Para possível comparação dos resultados obtidos, recorreu-se a análise estatística. Os gráficos apresentados (concentração dos compostos vs proliferação celular relativa) foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre os diferentes ensaios foi analisada através do cálculo do teste *t-Student*, para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. Esta diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .



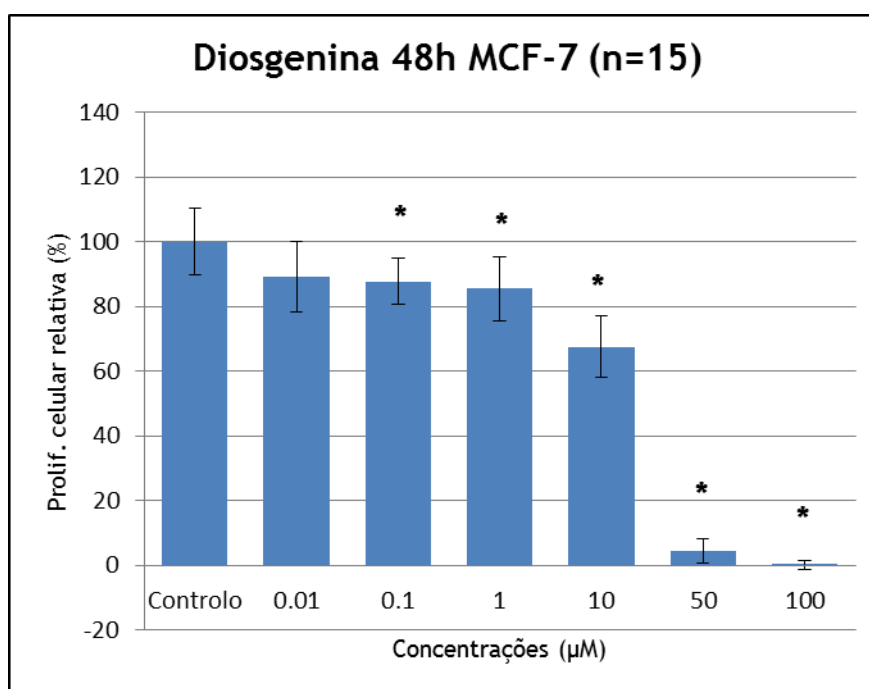
## IV. Resultados e Discussão

### IV.1. Efeito dos compostos na viabilidade celular das células MCF-7 e LNCaP

#### IV.1.1 Ensaios de proliferação celular (Ensaio MTT)

A fim de avaliar o efeito dos compostos Diosgenina, Tamoxifeno, Flutamida e suas combinações na proliferação celular das células MCF-7 e LNCaP realizaram-se vários ensaios MTT em ambas as linhas celulares.

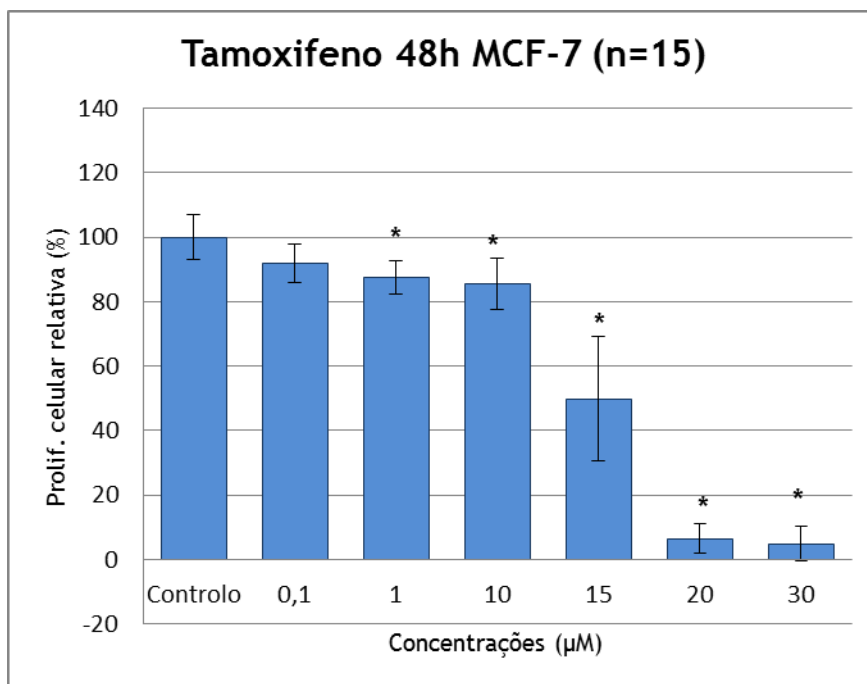
Inicialmente para as células MCF-7 e com o objetivo de definir as condições para o estudo do efeito da combinação de compostos, procedeu-se, em primeiro lugar, a ensaios em separado nos quais as células foram tratadas com concentrações distintas de Diosgenina (0,01 $\mu$ M; 0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M; 50  $\mu$ M; 100  $\mu$ M) e de Tamoxifeno (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M; 15  $\mu$ M; 20  $\mu$ M; 30  $\mu$ M) por um período de 48 horas. Os resultados destas experiências estão apresentados nas figuras 11 e 12. A escolha das concentrações a estudar teve por base estudos realizados anteriormente pelo grupo de investigação no qual este projecto se insere e o tempo de exposição de 48 horas deve-se ao facto do ciclo celular das células ser superior a 24 horas e inferior a 48 horas, por conseguinte é possível avaliar o efeito dos compostos num ciclo celular completo.



**Figura 11:** Proliferação celular relativa das células MCF-7 incubadas por 48 horas com Diosgenina, nas concentrações de 0,01 $\mu$ M a 100 $\mu$ M em meio de cultura DMEM com FBS. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste  $t$ -student).

Analisando os resultados obtidos nas experiências com o composto Diosgenina a 48 horas de exposição, constata-se pela figura 11 que as baixas concentrações (0,01 $\mu$ M e 0,1 $\mu$ M) parece não haver qualquer efeito significativo sobre a proliferação celular. Observa-se que ocorre uma ligeira diminuição na taxa de proliferação celular a partir da concentração 10 $\mu$ M e que essa diminuição se acentua nas concentrações 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M sendo aqui praticamente inexistente a proliferação observada. Na parte I do anexo desta dissertação pode observar-se que, comparativamente ao controle - que não apresenta alterações significativas detectáveis ao microscópio de fluorescência no ensaio AO/PI, algumas das células tratadas com Diosgenina a 10 $\mu$ M apresentam ligeiras alterações na sua morfologia, como uma forma arredondada e observa-se que células tratadas com Diosgenina a 50 $\mu$ M apresentam uma completa alteração na sua morfologia - forma arredondada e tamanho reduzido - bem como uma possível redução do número de células detectáveis ao microscópio. Sabe-se que a Diosgenina tem propriedades anticancerígenas, entre as quais, efeito antiproliferativo em células cancerígenas e indução da apoptose em muitos casos (Raju, J. and Rao, C. V. 2011). Particularmente, em células MCF-7, foi demonstrado que a Diosgenina desempenha atividade antiproliferativa de uma maneira dose-dependente e que, segundo Lee *et al.* (Lee, Y.-C. *et al.* 2012), exibe uma atividade relevante nas células MCF-7, sendo que a uma concentração de 20 $\mu$ M o perfil citotóxico da Diosgenina é elevado. Ainda de acordo com Lee e colaboradores o IC<sub>50</sub> para a Diosgenina, nas células MCF-7 a 48 horas, por eles calculado foi de 17,79  $\pm$  4.47 $\mu$ M (Lee, Y.-C. *et al.* 2012). Também num estudo realizado por Sowmyalakshmi e colaboradores (Sowmyalakshmi, S. *et al.* 2005) foi demonstrado que a diosgenina reduz significativamente a viabilidade das células MCF-7 a uma concentração de 25  $\mu$ M, o que vai de encontro aos nossos resultados cujo IC<sub>50</sub> por foi 20 $\mu$ M, e portanto se vê o declínio mais acentuado da proliferação a partir de uma concentração de 10 $\mu$ M. Apenas pelo ensaio do MTT não é possível esclarecer o mecanismo de ação da Diosgenina mas é possível observar que induz a inibição da proliferação celular

Avaliando as figuras 12 constata-se que, mesmo as baixas concentrações de Tamoxifeno (1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M), há uma diminuição estatisticamente significativa na proliferação celular. Na concentração de 15 $\mu$ M podemos observar uma variabilidade muito expressiva no resultado, que se reflete no desvio padrão observado e que existe diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Esta concentração de Tamoxifeno, apesar da variabilidade observada, é a que leva à inibição da taxa de proliferação celular para metade. Este composto é vastamente conhecido na comunidade científica e utilizado como agente anticancerígeno na terapia do CM, sendo um conhecido modelador dos ERs, em que o seu mecanismo de ação é mediado pela inibição competitiva do recetor, redução da secreção de fatores de crescimento e indução da morte celular programada.



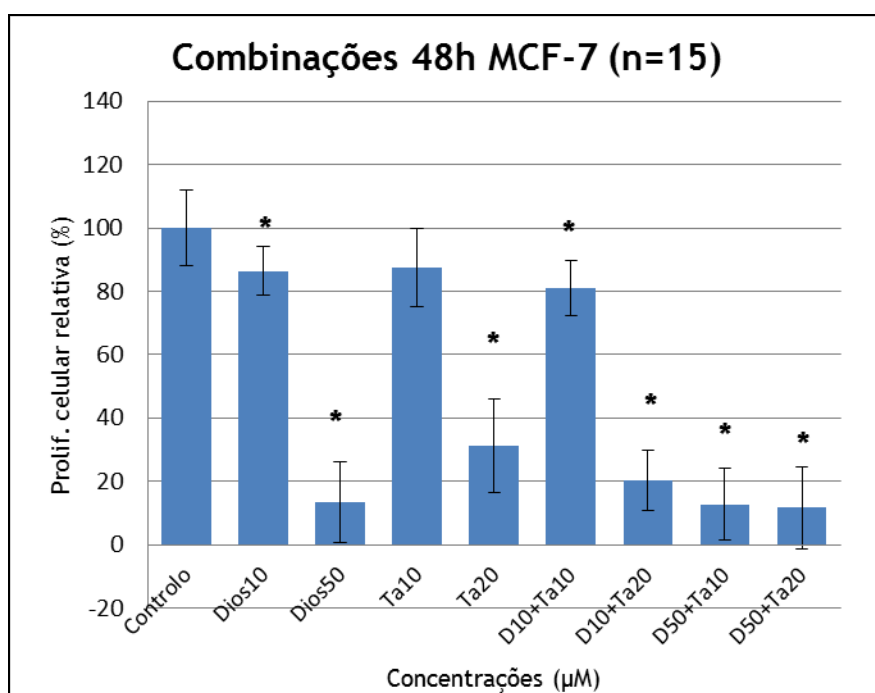
**Figura 12:** Proliferação celular relativa das MCF-7 incubadas por 48 horas com Tamoxifeno, nas concentrações de 0,1µM-30µM e meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas os desvios padrão. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*).

Tanto nas células normais da mama como as células MCF-7, que são positivas para os ER, a presença de estrogénios induz a sua proliferação e, no caso das células cancerígenas, promove a agressividade do tumor (Perry, R. R. and Greaves, B. 1995). O recurso ao Tamoxifeno como antagonista deverá induzir a inibição da proliferação celular dependente de hormonas (Kijima, I. *et al.* 2005) e tal afirmação parece ter concordância com os nossos resultados. Para Perry e seus colaboradores, a citotoxicidade induzida pelo Tamoxifeno nas células MCF-7 é dose-dependente, sendo que nesse estudo se observou que a partir da concentração de 10µM a taxa de sobrevivência reduzia para mais de metade ao fim de 48horas de exposição. Também segundo S.-C. Yan e colaboradores, se demonstrou a resposta dose-dependente do composto que, para uma concentração de 14µM, induz diminuição na viabilidade celular das células MCF-7 (Yan, S.-C. *et al.* 2011). Nos nossos resultados, nas concentrações 20µM e 30µM, é possível observar que, comparativamente ao controlo, a taxa de proliferação celular é mínima, e poderemos concluir que as concentrações de Tamoxifeno por nós testadas não dispersam das conhecidas na bibliografia e que evidenciam o elevado efeito citotóxico de Tamoxifeno nas células MCF-7.

A realização de ensaios de proliferação celular (ensaio MTT) com os compostos Diosgenina e Tamoxifeno, em separado, permitiu-nos avaliar como é que os compostos afetaram a proliferação celular das MCF-7. Tal avaliação ajudou-nos a equacionar quais as possíveis concentrações a combinar, que pudessem acrescentar alguma informação à já adquirida e para equacionar o seu uso combinado na terapia destes tipos de cancro. Foram escolhidas as concentrações de Diosgenina 10µM e Diosgenina 50µM para combinação com Tamoxifeno 10µM

e Tamoxifeno 20 $\mu$ M, respetivamente. Esta opção reflete a intenção de escolher, para cada um dos compostos, uma concentração que tenha poucos ou nenhuns efeitos e outra que claramente afecte a proliferação celular, para verificar se as suas combinações têm alguma acção relevante.

Através da análise das figuras 13 é possível observar que existe uma diminuição significativa da proliferação celular nas concentrações mais elevadas dos dois compostos (Diosgenina 50 $\mu$ M e Tamoxifeno 20 $\mu$ M) bem como na sua combinação (Dios50 $\mu$ M+Ta20 $\mu$ M), comparando com o controlo. É ainda visível que ocorre diminuição idêntica da proliferação celular nas combinações de Diosgenina 10 $\mu$ M com Tamoxifeno 20 $\mu$ M e Diosgenina 50 $\mu$ M com Tamoxifeno 10 $\mu$ M. Na secção I do Anexo desta dissertação é possível observar as alterações morfológicas, como a aparente redução no tamanho e número de células, detectáveis a microscópio, nas células MCF-7 quando expostas a Diosgenina50 $\mu$ M+Tamoxifeno10 $\mu$ M em comparação com o controlo.

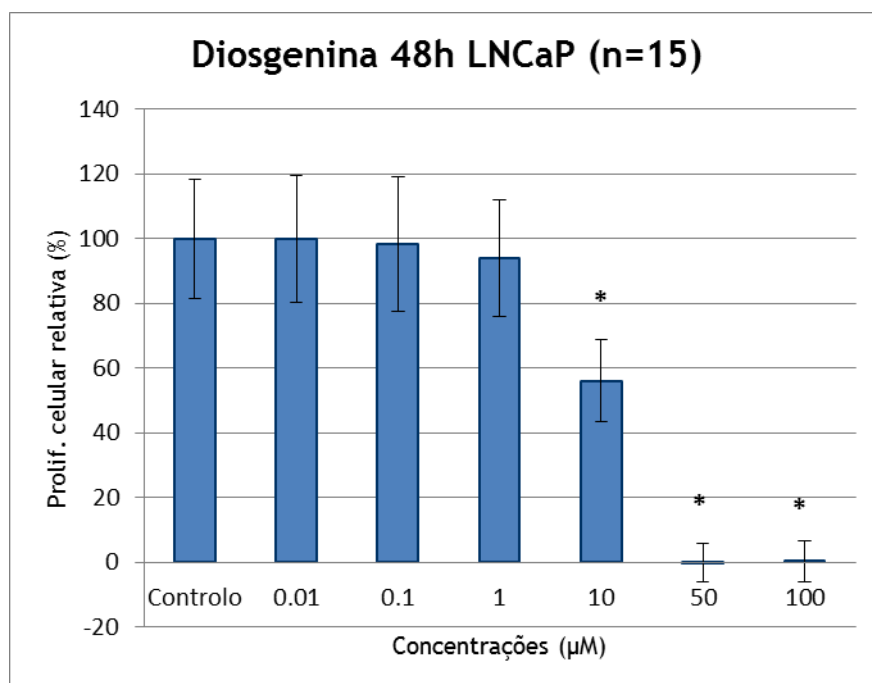


**Figura 13:** Proliferação celular relativa das MCF-7 incubadas por 48 horas com combinações de compostos, nas concentrações representadas no gráfico Dios - Diosgenina (D); Ta - Tamoxifeno; em meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as e as linhas os desvios padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-student*).

Nas concentrações mais baixas dos compostos (Diosgenina 10 $\mu$ M, Tamoxifeno 10 $\mu$ M e sua combinação) a taxa de proliferação mantém-se próxima da do controlo (Figuras 13). Na combinação de Diosgenina10 $\mu$ M com Tamoxifeno10 $\mu$ M foi possível observar que algumas células apresentavam aspeto arredondado (ver Anexo secção I), que se pode relacionar com uma ligeira diminuição da viabilidade comparativamente com o controlo e com os compostos nas concentrações em separado. Os resultados aqui visíveis têm concordância com os

resultados obtidos anteriormente nas experiências em separado (Figuras 11 e 12), com a exceção de Tamoxifeno 20 $\mu$ M, cujo valor de percentagem obtido não é concordante. Tal facto poderá ser explicado pela variabilidade de resultados, a qual se traduziu no valor de desvio-padrão apresentado. Como já foi mencionado, tanto a Diosgenina como o Tamoxifeno são conhecidos pelo seu perfil anticancerígeno em células do CM (Sowmyalakshmi, S. *et al.* 2005; Mai, Z. *et al.* 2007; Nilsson, U. W. *et al.* 2009), sendo que atuam especialmente como inibidores da proliferação celular. Pelos nossos resultados é bem evidente esse perfil citotóxico pela manifesta diminuição da proliferação nas concentrações mais elevadas de ambos. Com a combinação das concentrações elevadas (Diosgenina 50 e Tamoxifeno 20) o efeito não se contrariou, ou seja, a citotoxicidade dos fármacos manteve-se, no entanto, outros estudos serão necessários para perceber de que forma essa combinação afeta a viabilidade das células MCF-7 e a sua potencial aplicação no tratamento do CM. De destacar ainda que não se observaram comportamentos sinérgicos da combinação destes compostos.

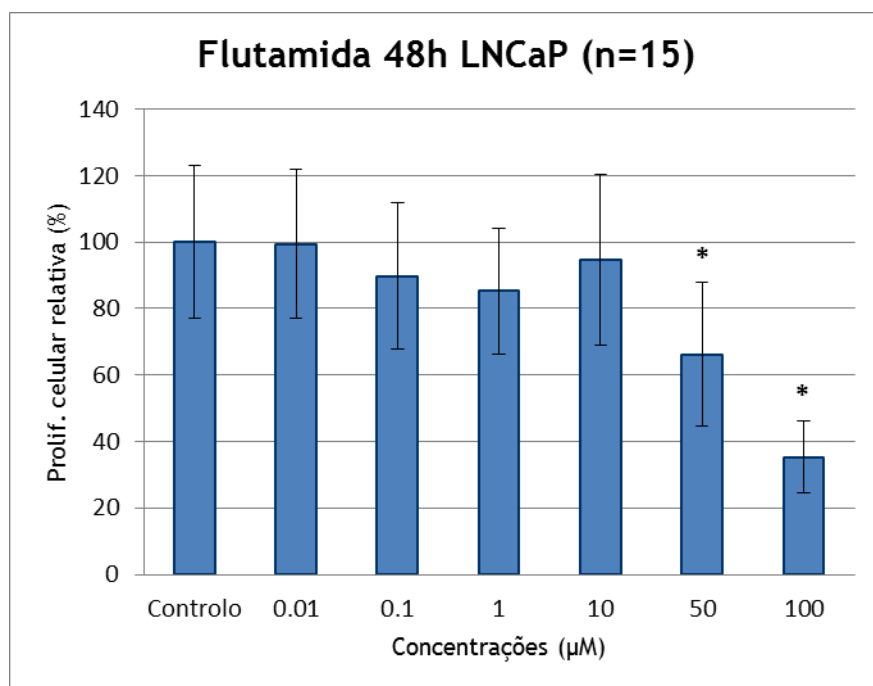
De acordo com um dos objetivos do presente trabalho foi determinado, igualmente, o perfil citotóxico da Diosgenina nas células LNCaP assim como a sua possível combinação com um agente anticancerígeno já conhecido e utilizado na terapia do CP, a Flutamida. Para tal, realizaram-se inicialmente ensaios de proliferação celular nos quais as células foram tratadas com diferentes concentrações de Diosgenina (0,01 $\mu$ M a 100 $\mu$ M). Os resultados obtidos estão representados na figura 14.



**Figura 14:** Proliferação celular relativa das LNCaP incubadas, por 48 horas, com Diosgenina, nas concentrações de 0,01 $\mu$ M-100 $\mu$ M e meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

Fazendo a leitura dos gráficos, observa-se que em concentrações baixas (0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M e 1 $\mu$ M), não existem diferenças estatisticamente significativas de proliferação celular em relação ao controlo. Por sua vez, a 10 $\mu$ M já existe diferença significativa em relação ao controlo e pode observar-se que há um decréscimo da taxa de proliferação celular para cerca de metade, o que corresponderá aproximadamente ao IC<sub>50</sub> da Diosgenina nas células LNCaP. A variabilidade dos resultados obtidos na concentração 10 $\mu$ M, traduz-se nos desvios padrão observados para essa concentração. Nas concentrações mais elevadas (50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) não se observou proliferação celular significativa, pelo ensaio de viabilidade, o que vai de encontro com a informação que a fotografia obtida no ensaio por microscopia, presente na secção II do anexo, nos dá - as células tratadas com Diosgenina 50 $\mu$ M estão todas morfologicamente alteradas em comparação com o controlo, que se poderá relacionar com a redução/ausência de proliferação celular. Não são conhecidos por nós estudos sobre a influência da Diosgenina na viabilidade de células LNCaP, pelo que, para que se possa concluir que esta tem algum efeito sobre a viabilidade, são necessários ainda mais estudos que o comprovem.

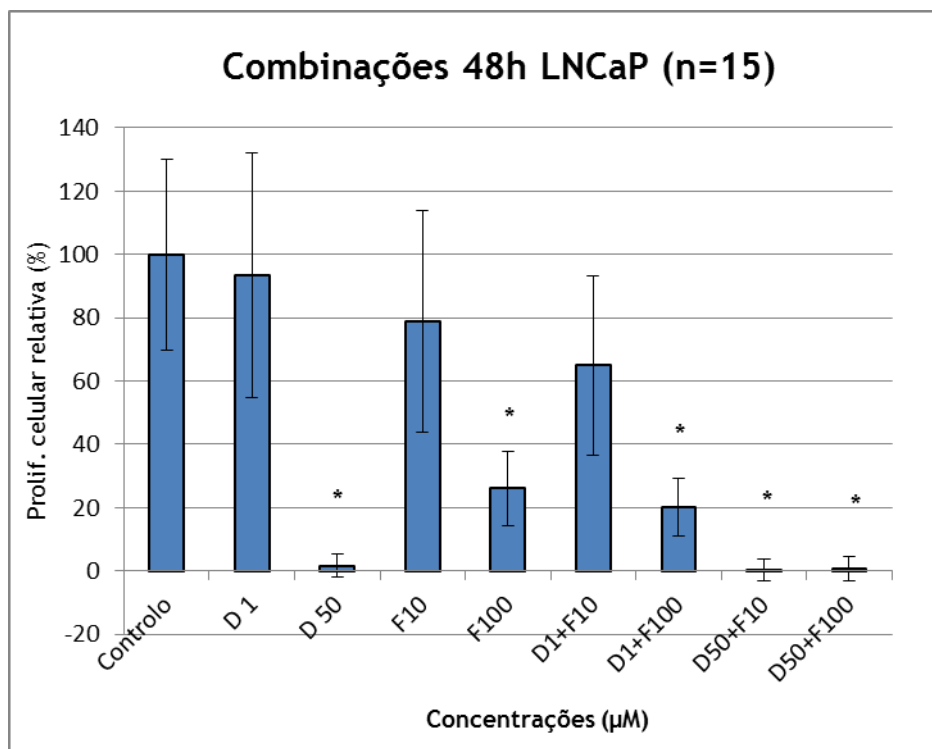
Para o estudo da Flutamida na viabilidade celular das LNCaP foram feitos ensaios em condições similares às da experiência anterior. As concentrações do composto foram de 0,01 $\mu$ M a 100 $\mu$ M e o tempo de exposição ao mesmo manteve-se também em 48 horas. Os resultados obtidos estão representados na figura 15.



**Figura 15:** Proliferação celular relativa das LNCaP incubadas, por 48 horas, com Flutamida, nas concentrações de 0,01 $\mu$ M-100 $\mu$ M e meio de cultura DMEM com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas, o desvio padrão (na figura 10). \* $p < 0,05$  versus respectivo controlo (teste *t*-student).

Sabe-se que a Flutamida é um fármaco utilizado na terapia do CP, e que inibe a ação dos esteróides androgénicos nas células-alvo, em particular, nas células cancerígenas da Próstata, o que tem como consequência a inibição do crescimento do tumor (Schröder, F. 1998). Portanto, será de se esperar a inibição da proliferação celular das células LNCaP como consequência de exposição a este fármaco. Pela análise das figuras 15, pode-se constatar que nas concentrações de 0,01 $\mu$ M a 10 $\mu$ M não há diferença estatisticamente significativa na proliferação celular em comparação ao controlo. Na concentração de 10 $\mu$ M a proliferação celular parece ser um pouco maior comparativamente com as concentrações 0,1 $\mu$ M e 1 $\mu$ M. Na concentração de 50 $\mu$ M já é visível uma diminuição da proliferação mas na fotografia obtida por microscopia ótica (secção II-2 do anexo), não se observaram quaisquer alterações morfológicas evidentes nas células expostas ao composto a esta concentração. A 100 $\mu$ M é evidente o decréscimo significativo da proliferação das células LNCaP, todavia, e de acordo com a imagem presente no anexo - secção II-3, ainda são detectáveis ao microscópio um número considerável de células com a sua morfologia intacta, o que poderá explicar a taxa de, aproximadamente, 30% de proliferação observada com essa concentração. Sendo assim, a Flutamida, ao ter algum efeito citotóxico nas células LNCaP, esse efeito será menos marcado comparativamente ao da Diosgenina, nas condições do presente ensaio. É de destacar a variabilidade dos resultados obtidos, que se refletiu nos desvios-padrão observados.

Realizados os ensaios que contribuiram para a análise do efeito dos compostos na viabilidade celular das células LNCaP e definir possíveis combinações dos mesmos, procedeu-se a novas experiências. Para tal, foram escolhidas as concentrações 1 $\mu$ M e 50 $\mu$ M de Diosgenina e 10 $\mu$ M e 100 $\mu$ M de Flutamida. A escolha das concentrações prende-se com o facto de se escolher concentrações nas quais não se observou, nos ensaios anteriores, diferenças na proliferação (1 $\mu$ M Diosgenina e 10 $\mu$ M Flutamida) e nas quais se observou diminuição (50 $\mu$ M Diosgenina e 100 $\mu$ M), comparativamente ao Controlo. Os resultados obtidos nos ensaios com estas combinações estão representados na figura 16. Observando os resultados obtidos, verifica-se que, em concentrações de 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de Diosgenina e Flutamida, respetivamente, não há diferença estatisticamente significativa da proliferação celular relativamente ao controlo. Embora pareça haver uma diminuição da proliferação nas células tratadas com Diosgenina 1 $\mu$ M+Flutamida 10 $\mu$ M, esta não é estatisticamente significativa. É de salientar a variabilidade dos resultados obtidos nestas concentrações, o que se reflete nos desvios-padrão observados. Os resultados observados nas concentrações Diosgenina 50 $\mu$ M e Flutamida 100 $\mu$ M (isoladamente) vão de encontro com os resultados obtidos nas experiências anteriores.



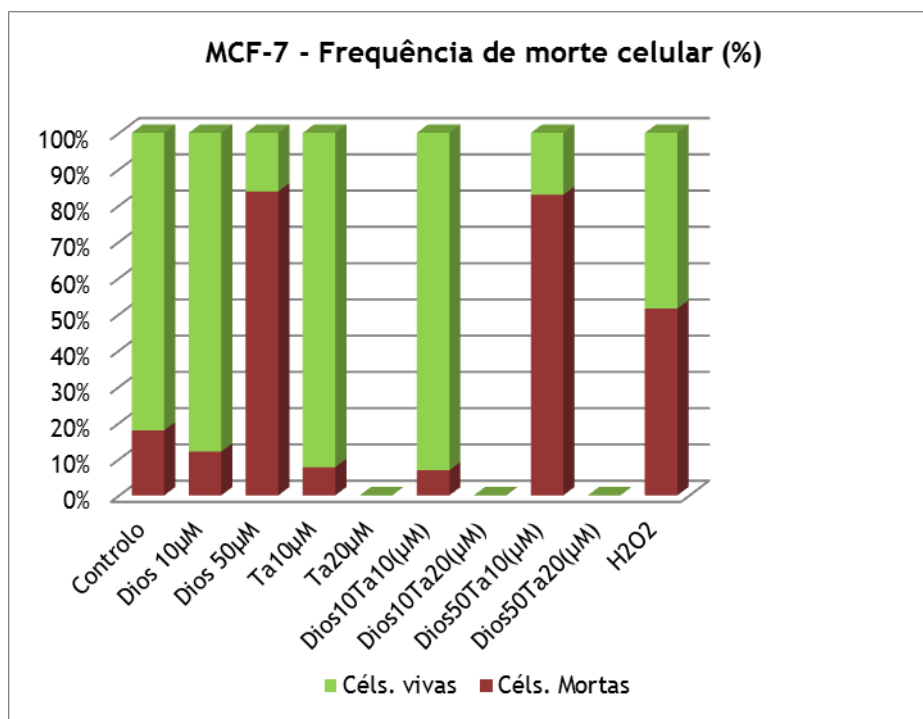
**Figura 16:** Proliferação celular relativa das LNCaP incubadas por 48 horas com combinações de compostos, nas concentrações representadas no gráfico, D - Diosgenina; F - Flutamida; em meio de cultura RPMI com FBS. Controlo - células sem tratamento. Os dados estão expressos como percentagem de proliferação celular em relação ao controlo. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-student*).

Constata-se, portanto, a diminuição total da proliferação com Diosgenina 50µM e um decréscimo significativo da mesma com Flutamida 100µM. Na condição Diosgenina1µM + Flutamida100µM observa-se uma redução na proliferação em relação ao controlo similar à observada para a Flutamida a 100µM. É possível verificar também que quando se combina Diosgenina 50µM com Flutamida 10µM e 100µM há completa inibição da proliferação celular, em relação ao controlo. Apesar de se observar efeito na viabilidade celular nas concentrações elevadas das combinações, para conseguirmos concluir mais objetivamente se estes compostos têm efeito aditivo quando combinados são necessários mais estudos que nos indiquem, por exemplo, o tipo de morte celular.

#### IV.1.2 Análise da frequência de morte celular por microscopia de fluorescência

Com o intuito de identificar e quantificar a possível morte celular nas células MCF-7 e LNCaP desencadeada pelos compostos, procedeu-se a uma técnica usando microscopia de fluorescência na qual as células foram previamente coradas por uma solução de AO/IP após exposição aos compostos durante 48h. Esta técnica teve por base a análise de imagens adquiridas através do microscópio, o que permitiu quantificar o número de células existentes em cada fotografia/concentração distinta, a sua distinção entre células vivas e células mortas, de acordo com a fluorescência que emitem, e possíveis alterações na sua morfologia

(tamanho, conservação do núcleo, entre outras). Nas figuras 17 e 18 apresentadas de seguida está representada a frequência de morte celular observada para cada tipo de célula e para cada concentração ou concentrações dos compostos expostos, após 48 horas de exposição aos mesmos. Para cada linha celular foi realizada uma experiência. Relativamente à população celular, foi contabilizado um número indefinido de fotografias diferentes para cada condição até contabilizar no mínimo 100 células/condição.

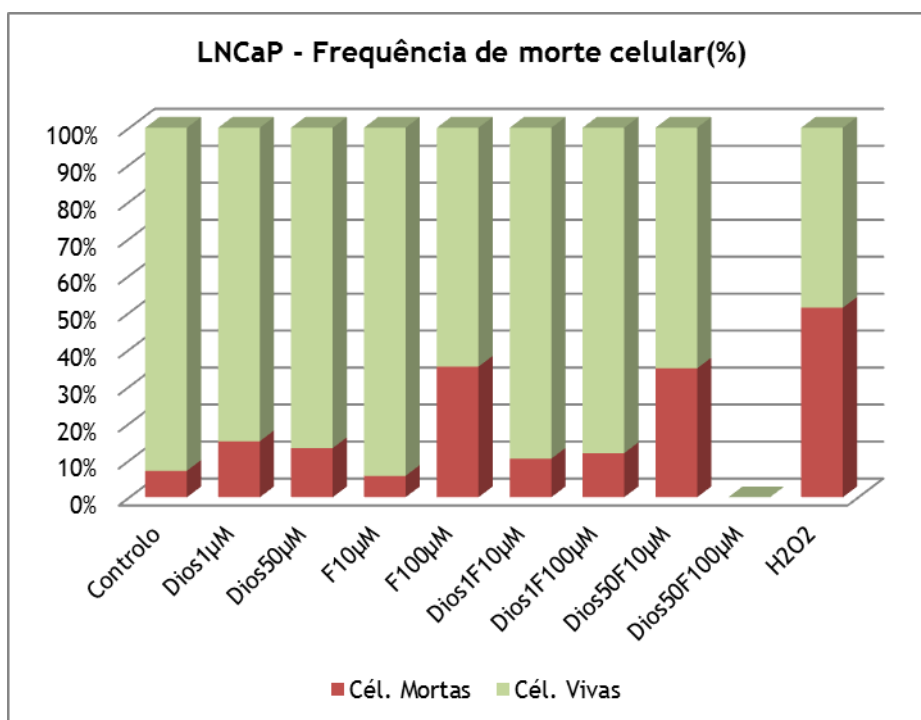


**Figura 17:** Análise de microscopia de fluorescência nas células MCF-7. Controlo negativo para apoptose: células em cultura apenas em meio DMEM com FBS. Controlo positivo para apoptose: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Dios: Diosgenina; Ta: Tamoxifeno; Frequência de morte celular expressa em percentagem (%).

Pela análise da figura 17 constata-se que nas concentrações mais baixas dos compostos Diosgenina e Tamoxifeno (10µM) e sua combinação, a frequência de morte celular é inferior a 10% o que vai de encontro com os resultados obtidos na figura 13 respeitante aos ensaios de MTT nas células MCF-7, onde nessas concentrações não se verificou diminuição significativa da proliferação celular relativamente ao controlo. No gráfico da figura 17 verifica-se que a frequência de morte celular das células sem qualquer tratamento, as quais, de acordo com o protocolo adaptado (Gomes Cornélio, A. L. *et al.* 2011), são o controlo negativo para apoptose é superior às células com tratamento com concentrações baixas, tal facto não se conseguiu justificar mas não era de se esperar. Pela leitura da figura 17 é também possível observar que nas condições Diosgenina 50µM e Diosgenina 50µM+Tamoxifeno10µM a frequência de morte celular é elevada comparativamente às células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controlo positivo para apoptose). A maior percentagem de morte celular observada nessas condições, juntamente com os resultados observados nos ensaios de viabilidade celular (MTT) (Figura 13) sugere que a atividade antiproliferativa da Diosgenina, nas condições de

tratamento mencionadas, se poderá manifestar tanto por inibição da proliferação celular como por indução de morte celular, o que vai de encontro com a literatura (Srinivasan, S. *et al.* 2009; Podolak, I. *et al.* 2010). Para as condições Tamoxifeno 20 $\mu$ M, Diosgenina 10 $\mu$ M+Tamoxifeno20 $\mu$ M e Diosgenina50 $\mu$ M+Tamoxifeno20 $\mu$ M não foi possível apresentar dados relativos à frequência de morte celular uma vez que o número de células para análise, em cada uma dessas condições, foi inferior a 100 células no total de fotografias adquiridas/condição. Poderá equacionar-se que os compostos nessas concentrações apresentaram um forte perfil citotóxico para as células MCF-7, o que se reflete no número reduzido (não significativo) de células presentes no *well* respectivo - este facto vai de encontro aos dados dos ensaios MTT acima descritos. Mais estudos de microscopia de fluorescência serão necessários para comprovar a citotoxicidade dos compostos nessas condições.

Relativamente ao mesmo ensaio nas células LNCaP, os resultados obtidos após análise das imagens obtidas por microscopia de fluorescência, estão representados na figura 18.



**Figura 18:** Análise de microscopia de fluorescência nas células LNCaP. Controlo negativo para apoptose: células em cultura apenas em meio RPMI 1640 com FBS. Controlo positivo para apoptose: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Dios: Diosgenina; F: Flutamida; Frequência de morte celular expressa em percentagem (%) (n=1).

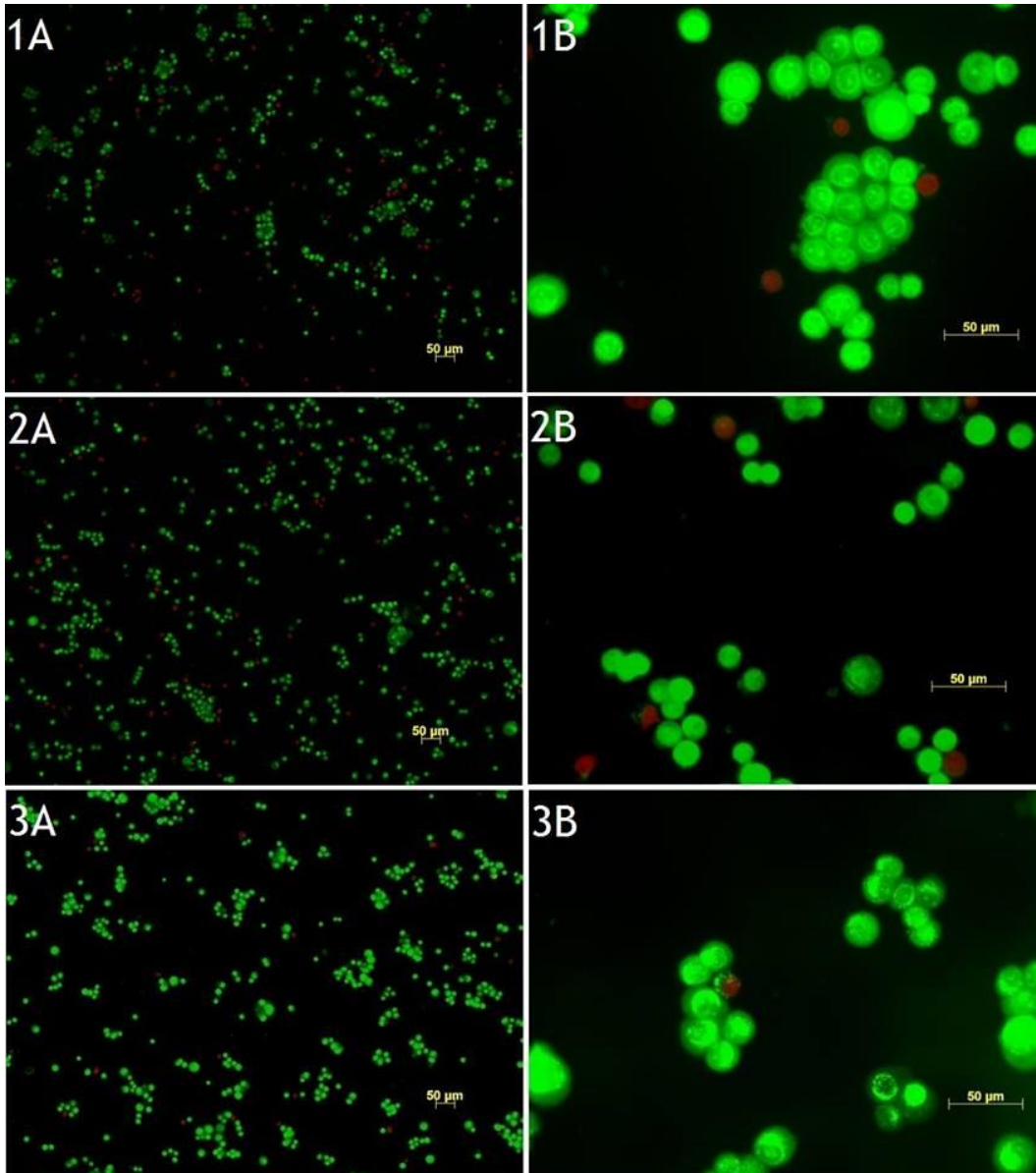
Pela observação da figura 18, constata-se que em todas as condições a percentagem de morte celular é inferior ao valor expresso pelas células tratadas com o controlo positivo para apoptose, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que poderá evidenciar um fraco perfil citotóxico destas combinações de compostos na viabilidade das células LNCaP. Apenas nas condições Flutamida100 $\mu$ M e Diosgenina50 $\mu$ M+Flutamida10 $\mu$ M é visível frequência de morte celular já bem destacada

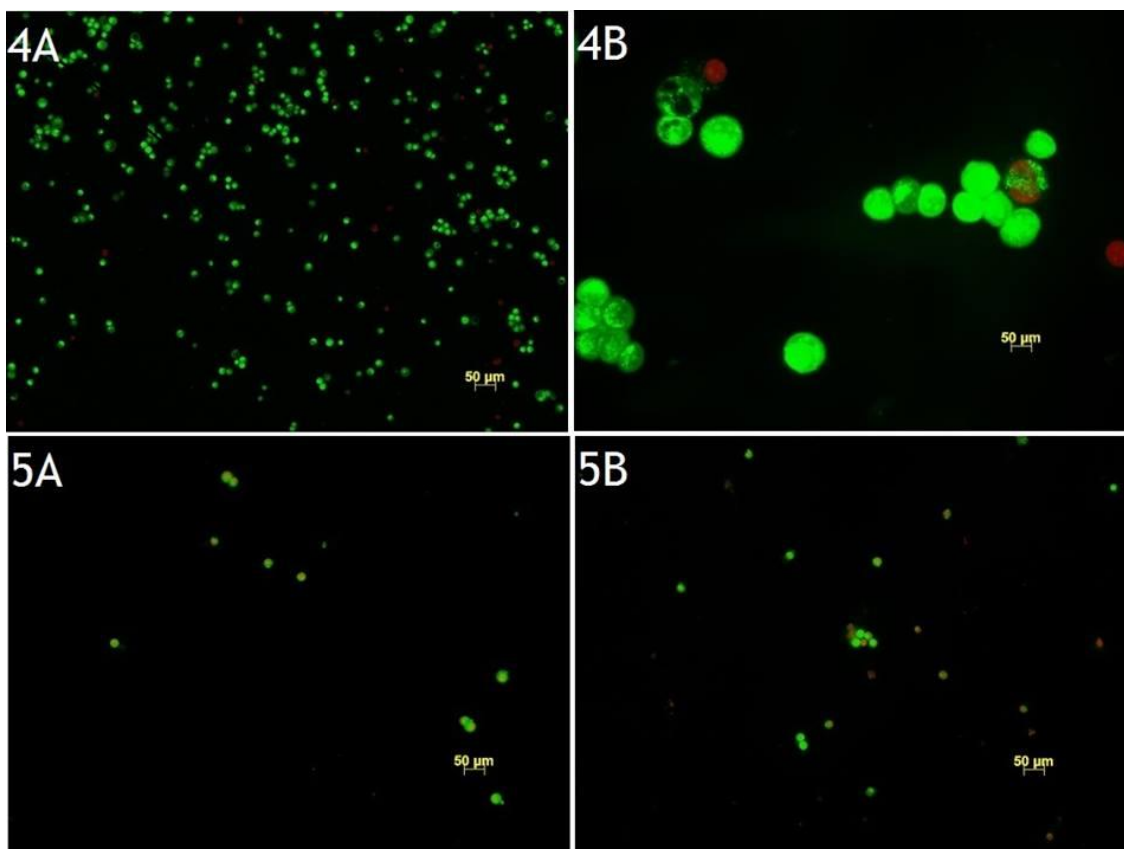
comparativamente ao controlo. Seria de esperar, de acordo com as experiências anteriores, que as células tratadas com Diosgenina 50 $\mu$ M apresentassem maior frequência de morte celular. Contudo, analisando as fotografias da microscopia na figura 20 5A é visível a diminuição de população celular relativamente ao controlo (figura 20 1A) e a uma ampliação 40X (Figura 20 5B) consegue observar-se também a existência de células marcadas com IP, que segundo Vermes et al. emitem fluorescência vermelha, caso se trate de uma célula morta (Vermes, I. *et al.* 2000). Relativamente ao efeito da combinação de Diosgenina e Flutamida na frequência de morte celular, quando se combina Diosgenina 1 $\mu$ M com as duas concentrações de Flutamida não se verificam diferenças marcadas na percentagem de morte celular em comparação com as percentagens de morte celular dos compostos em separado (Diosgenina 1 $\mu$ M e Flutamida 10 $\mu$ M), excepto no caso da Flutamida 100 $\mu$ M, em que a frequência de morte celular é consideravelmente superior. Por estes factos, não é possível confirmar por este ensaio, que a Diosgenina tem efeito aditivo ao efeito da Flutamida.

No desenvolvimento e análise da técnica de microscopia verificou-se que os filtros presentes no microscópio onde se realizou a técnica são ligeiramente largos relativamente aos filtros mencionados na literatura (Takahashi, A. *et al.* 2004; Gomes Cornélio, A. L. *et al.* 2011). O AO intercala-se em várias estruturas celulares e apresenta diferentes propriedades de fluorescência pelo que não é selectivo para o DNA. Com a utilização de filtros mais largos, como foi no nosso caso, é difícil a interpretação das imagens adquiridas pois não foi possível definir um critério rigoroso de avaliação e portanto não se conseguiu distinguir concretamente as diferentes estruturas celulares. O IP permite distinguir as células que perderam a sua integridade membranar, uma vez que apenas consegue penetrar nesse tipo de células, e fluoresce na zona do vermelho (Vermes, I. *et al.* 2000).

Na figura 19 estão apresentadas algumas das fotografias obtidas através dos ensaios por microscopia de fluorescência das células MCF-7. As imagens 1-A e 1-B dizem respeito às células controlo, as quais foram apenas mantidas em meio de cultura DMEM com FBS. Constata-se que existem algumas células mortas (marcadas a vermelho), o que se traduziu em alguma frequência de morte celular embora tal constatação seja inconclusiva com apenas uma experiência. Com uma ampliação de 40X (imagem 1B) podemos observar que, aparentemente, as células estão com a sua morfologia intacta e apresentam núcleo e estruturas celulares brilhantes que poderá traduzir a sua integridade. Nas imagens 2A e 3A da mesma figura observa-se que as células expostas, tanto à Diosgenina 10 $\mu$ M (2A), como ao Tamoxifeno 10 $\mu$ M (imagem 3A), parecem ter o mesmo aspeto e características que as células controlo (imagem 1A). Da mesma forma, as células tratadas com Diosgenina 10 $\mu$ M+Tamoxifeno 10 $\mu$ M (Figura 19 imagem 4A) não apresentam diferenças observáveis comparando com o controlo. O mesmo já não se pode dizer pela análise das imagens 5 e 6 (Figura 19), que dizem respeito às células tratadas com Diosgenina 50 $\mu$ M e Diosgenina 50 $\mu$ M+Tamoxifeno 10 $\mu$ M, respetivamente, onde se observa uma diminuição

marcada do número de células. Nas imagens das células expostas a estas concentrações (imagem 5 e 6, Figura 19) de compostos observou-se que existiam células verdes e vermelhas sobrepostas, o que poderá indicar que as células mortas na condição Diosgenina 50 $\mu$ M morrem de forma diferente à das células que morreram no controlo (1A). No entanto, é necessário proceder à repetição de mais experiências para se tirar mais conclusões.

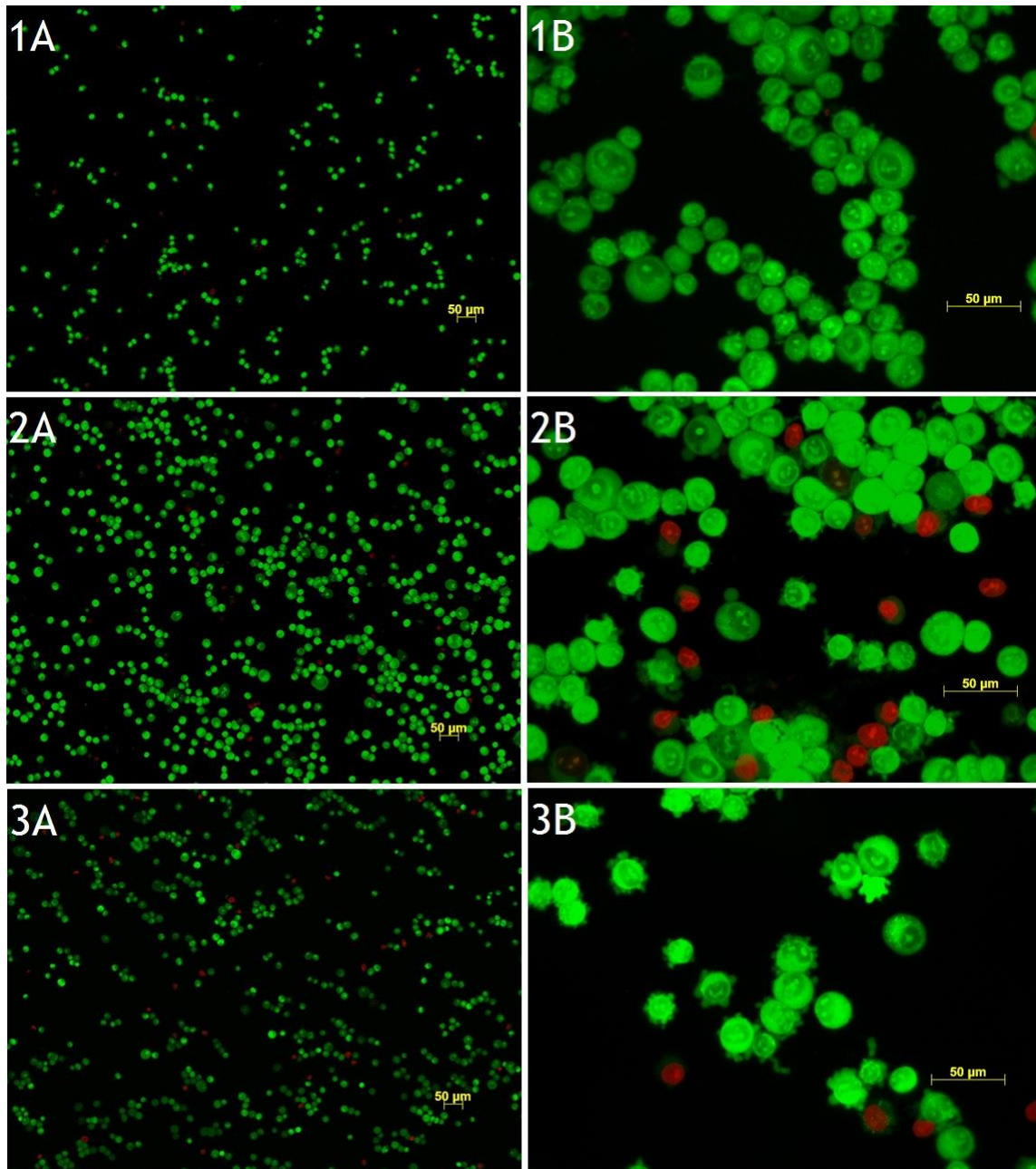


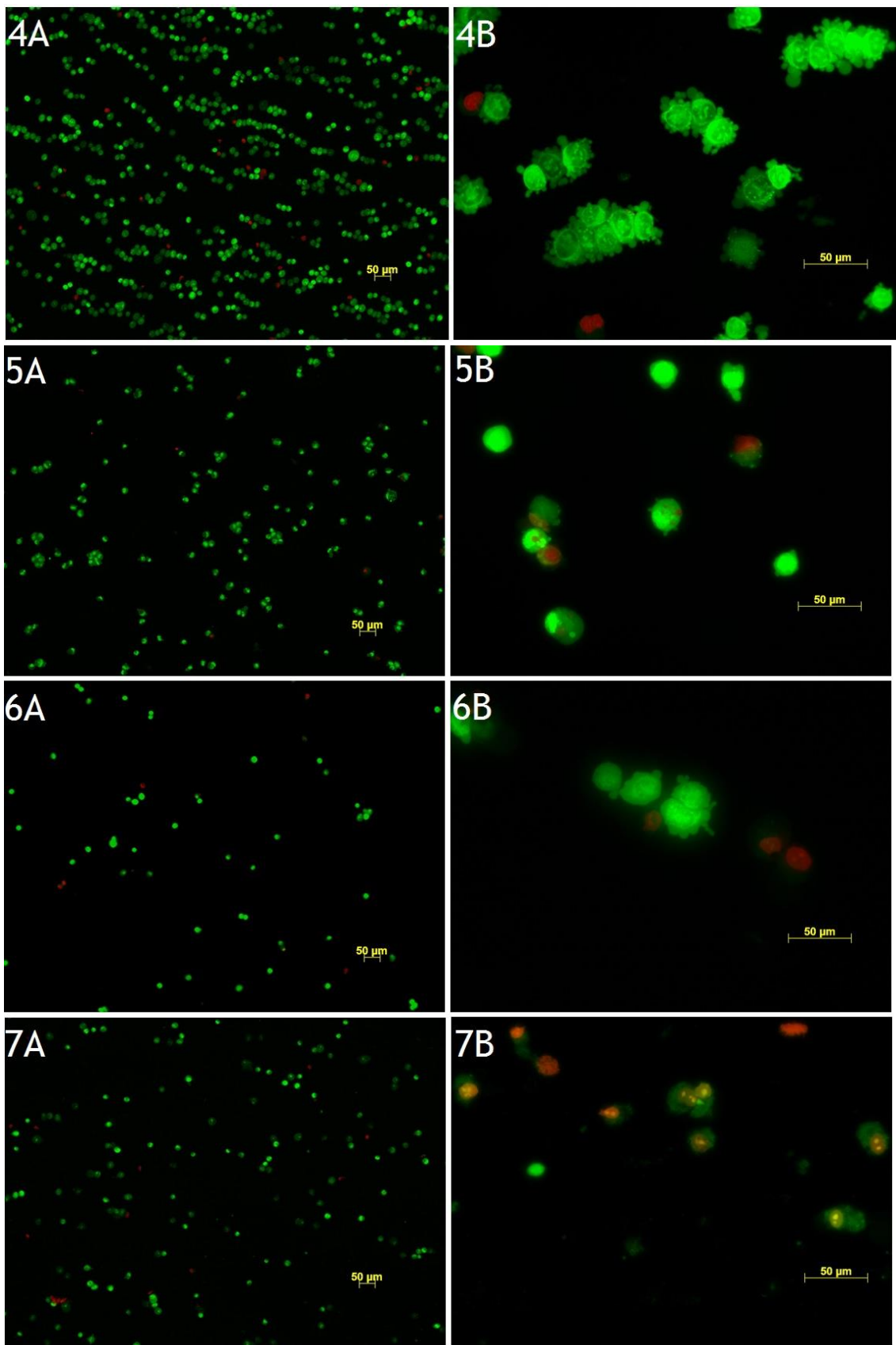


**Figura 19:** Micrografias fluorescentes das células MCF-7, após tratamento de 48 horas com os compostos. Ampliações: A- 10X; B-40X; 1 - Controlo, células tratadas apenas com meio DMEM com FBS. 2- Células expostas a Diosgenina 10µM; 3- Células expostas a Tamoxifeno 10µM; 4- Células expostas a Diosgenina 10µM+Tamoxifeno 10µM; 5- Células expostas a Diosgenina 50µM; 6- Células expostas a Diosgenina 50µM+Tamoxifeno 10µM; Para n=1, ≥100 células por condição.

Foram igualmente adquiridas fotografias, após 48 horas de exposição aos compostos, às células LNCaP. A figura 20 representa algumas das imagens obtidas através da microscopia de fluorescência neste ensaio. Pela visualização das mesmas podemos constatar que as células tratadas com Diosgenina 1µM (imagem 2A) e Flutamida 10µM (imagem 3A) não apresentam grandes diferenças comparativamente com a imagem do controlo (1 A). No entanto, na ampliação de 40X (imagem 2B) é evidente a presença de células mortas (manchadas a vermelho) na condição de Diosgenina 1µM, o que vai de encontro com a ligeira percentagem de morte celular observada no gráfico de frequência celular (Figura 18). No controlo, tal como nas imagens 2B e 3B, é evidente a existência de prolongamentos redondos à volta das células. Esses prolongamentos poderão ser resultado do processo de tripsinização ao qual as células foram sujeitas antes da microscopia, o que poderá ter alterado a sua morfologia, ou então, como indica a literatura, poderão ser os chamados *blebes* (corpos apoptóticos) característicos da apoptose (Vermes, I. *et al.* 2000; Kroemer, G. *et al.* 2008). Devido à inexistência de maior número de ensaios, não é possível obter uma conclusão objetiva. Nas imagens 4B e 5B (Diosgenina 1µM+Flutamida 10µM e Diosgenina 50µM) é fácil identificar a completa alteração da morfologia celular, nomeadamente a presença mais acentuada de

prolongamentos celulares (4B) e um tamanho mais reduzido (5B) das células comparativamente ao controlo. Nas imagens 6 e 7 podemos observar uma redução na densidade celular, comparativamente ao controlo, a presença de prolongamentos celulares na imagem 6B e alteração da morfologia das células. As imagens apresentadas na figura 20 representam o total da amostra de cada condição que foi avaliada ao microscópio.



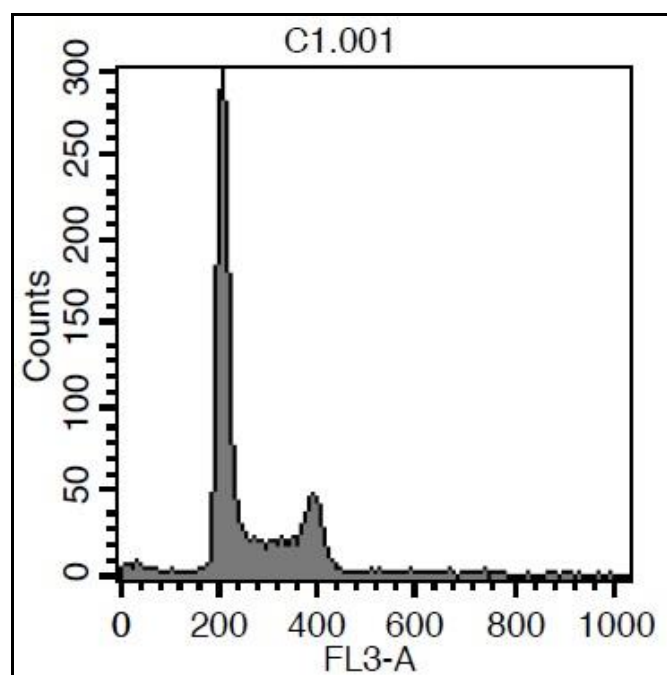


**Figura 20:** Micrografias fluorescentes das células LNCaP, após tratamento de 48 horas com os compostos. Ampliações: A- 10X; B-40X; 1 - Controle, células tratadas apenas com meio RPMI com FBS. 2- Células expostas a Diosgenina 1 $\mu$ M; 3- Células expostas a Flutamida 10 $\mu$ M; 4- Células expostas a

Diosgenina 1 $\mu$ M+Flutamida 10 $\mu$ M; 5- Células expostas a Diosgenina 50 $\mu$ M; 6- Células expostas a Flutamida 100 $\mu$ M; 7- Células expostas a Diosgenina 1 $\mu$ M+Flutamida 100 $\mu$ M; Para n=1,  $\geq$ 100 células por condição.

#### IV.1.3 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

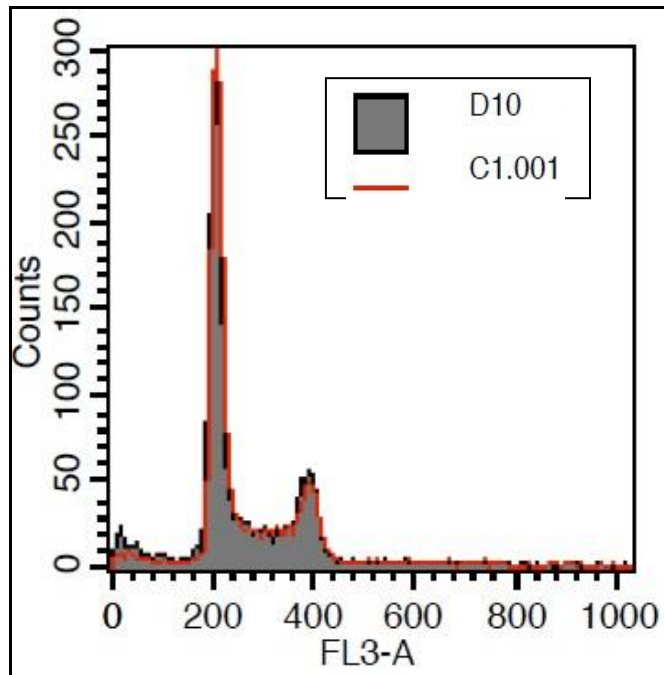
A fim de se analisar o ciclo celular das células MCF-7 expostas aos compostos em estudo, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, que nos fornece informações representativas dessa distribuição. O protocolo realizado para obtenção das amostras para análise no citómetro está explicado na parte experimental desta dissertação. Realizou-se um ensaio no qual as células MCF-7 foram expostas, por um período de 48 horas, a concentrações de Diosgenina 10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M, Tamoxifeno 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M e suas combinações. Os resultados obtidos por citometria estão apresentados nas figuras seguintes 21 a 27:



**Figura 21:** Análise do ciclo celular das células MCF-7. Controle: Células em meio DMEM com FBS, sem qualquer tratamento de composto. Nº total de eventos analisados = 9790.

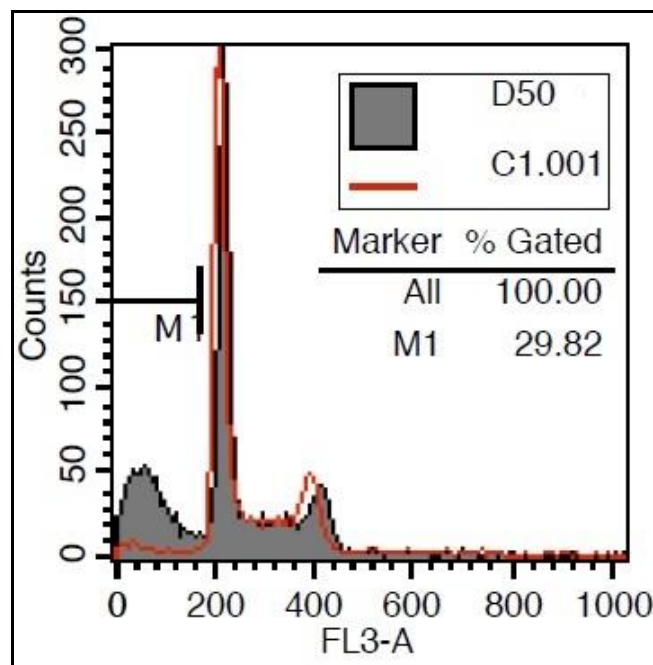
Para análise do ciclo celular nas células MCF-7 após exposição aos compostos, analisaram-se as figuras respeitantes a cada condição de compostos, comparativamente à figura do controlo Figura 21, que diz respeito à análise da distribuição celular de células sem tratamento de compostos.

Como foi mencionado na parte experimental, foi necessário criar 2 regiões no *software* de análise, para se excluir os eventos sem marcação que passam pelo citómetro (que poderão ser fragmentos sem DNA, "lixo") e excluir os agregados, a fim de não aparecerem na nossa análise e só serem observáveis os singletos e *debris* ("restos celulares com DNA").



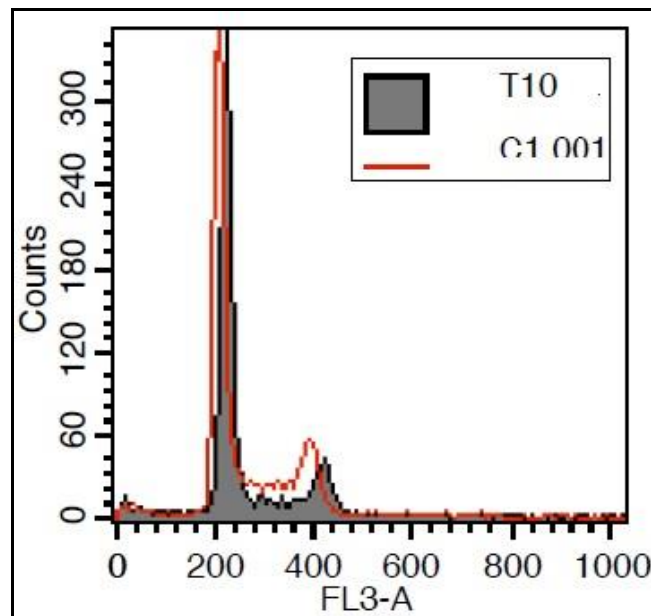
**Figura 22:** Análise do ciclo celular às células MCF-7 expostas a Diosgenina 10µM (D10) (Histograma a cheio e cinzento) comparativamente ao Controlo (Histograma a vermelho). Nº total de eventos analisados: 9201.

Pela análise da figura 22 podemos observar que não houve diferença observável na distribuição do ciclo celular comparativamente ao ciclo celular do controlo (região delimitada pela linha vermelha), pelo que poderemos afirmar que a Diosgenina a 10µM não tem efeito evidente na distribuição do ciclo celular das MCF-7.



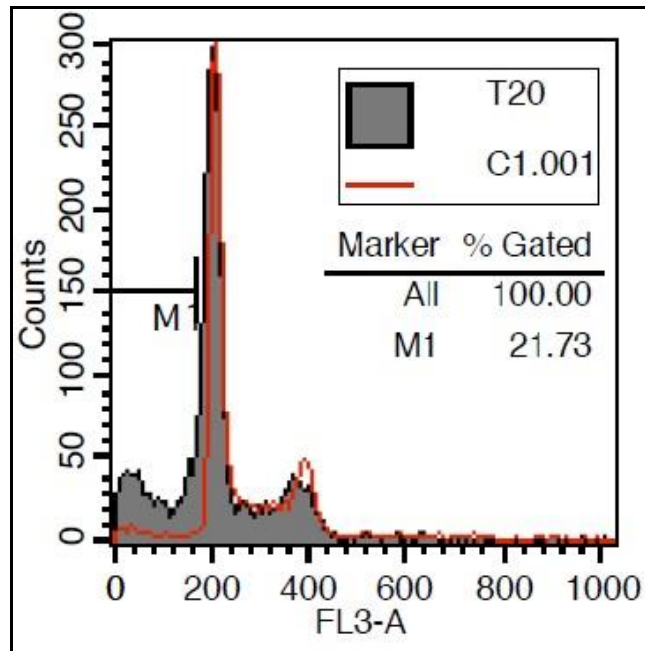
**Figura 23:** Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas a Diosgenina 50µM (D50). Nº total de eventos adquiridos: 9035 (100%). Região M1: Região de *Debris*.

Relativamente, à figura 23, é visível a existência de uma região M1 que representa a percentagem de *debris* (restos celulares que contêm DNA). Comparando com o controlo, a Diosgenina a 50 $\mu$ M parece não provocar efeito significativo na distribuição do ciclo celular. Muito provavelmente, de acordo com os resultados obtidos ao longo deste trabalho, e pela percentagem de restos celulares (região de *Debris* M1) este composto poderá induzir morte celular, como principal mecanismo de acção anticancerígena nas células MCF-7, mas não é possível concluir, por este resultado, se atua através da inibição da proliferação, se por morte celular ou se por ambos.



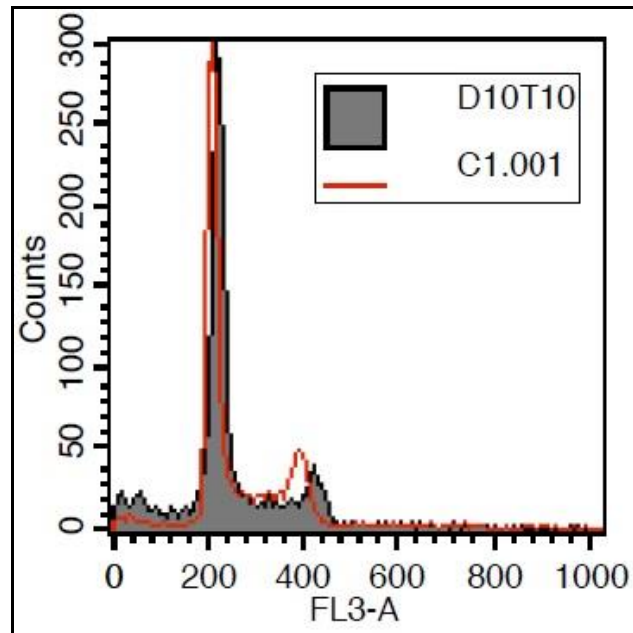
**Figura 24:** Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas a Tamoxifeno 10 $\mu$ M (T10) comparativamente com o controlo. Nº total de eventos: 9674.

Pela leitura da figura 24, observa-se uma alteração na distribuição do ciclo celular nas células MCF-7 quando expostas a Tamoxifeno 10 $\mu$ M, sendo que é visível que existe um menor número de células na fase S do ciclo celular comparativamente ao controlo. Tal facto pode sugerir-nos que existe inibição da proliferação celular por perturbação no ciclo celular. Tendo em conta a percentagem da região M1 (Secção III do anexo) comparativamente ao controlo e comparando os resultados obtidos por citometria para esta concentração de Tamoxifeno com os obtidos na experiência de microscopia, na qual a percentagem de morte celular para o Tamoxifeno 10 $\mu$ M era muito baixa, é possível equacionar que um dos mecanismos de ação anticancerígena do Tamoxifeno a esta concentração se poderá manifestar pela inibição da proliferação celular. No entanto, pelos ensaios de MTT a proliferação destas células expostas a esta concentração de compostos não foi afetada. A pouca variabilidade dos resultados (n=2) leva-nos a equacionar a realização de mais experiências para melhor entendimento do perfil citotóxico do Tamoxifeno nestas condições.



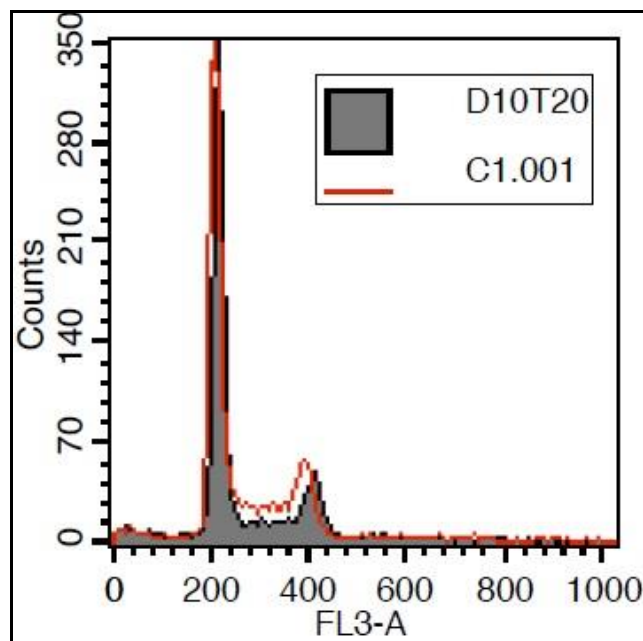
**Figura 25:** Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas a Tamoxifeno 20µM (T20) comparativamente ao controlo. Nº total de eventos adquiridos: 8925. Região M1 - região de *Debris*.

A figura 25, relativa à análise do ciclo das células expostas a Tamoxifeno 20µM, informa-nos que houve alteração na distribuição do ciclo celular. Essa alteração é evidente, se observarmos a percentagem de eventos na região M1 (21.73%), comparativamente ao controlo. Para além disso, podemos observar que a largura da base do pico G1 estende-se ligeiramente para a esquerda comparativamente com o controlo, o que poderá ser característico de morte por apoptose, uma vez que quando as células estão em processo de morte celular se observa a alteração da largura da base dos picos G1 e G2 (Baatout, S. and Derradji, H. 2004). Estes resultados vão de encontro com a bibliografia, onde é demonstrado o efeito do Tamoxifeno desencadear a acumulação de células na fase G1 do ciclo celular (induzir o seu arrastamento na fase G1), a 15µM (Ichikawa, A. *et al.* 2008), que é uma concentração próxima das por nós testadas. Apesar de haver aqui evidências de morte por apoptose nas células expostas a Tamoxifeno 20µM, não é possível comparar com os dados obtidos na microscopia de fluorescência uma vez que a população de células não era significativa para contagem e análise.



**Figura 26:** Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas à combinação de Diosgenina10µM+ Tamoxifeno10µM (D10T10). N° total de eventos adquiridos: 8363.

Analisando a figura 26, podemos observar uma alteração no ciclo celular comparativamente ao controlo, mas essa não se reflecte por uma alteração da distribuição da fase S, como seria de esperar, uma vez que se trata da adição de Tamoxifeno 10µM e, como vimos pela figura desta condição (figura 24), estava presente a diminuição do número de eventos em fase S comparando com o controlo. Desta forma, na combinação com Diosgenina não se verifica o efeito do Tamoxifeno 10µM no ciclo celular.



**Figura 27:** Análise do ciclo celular das MCF-7 expostas à combinação Diosgenina10µM+Tamoxifeno20µM (D10T20). N° total de eventos: 9517.

Podemos observar na figura 27 que, comparativamente ao controlo, existe uma alteração na distribuição do ciclo celular das células expostas a Diosgenina10 $\mu$ M+Tamoxifeno20 $\mu$ M. Essa alteração é evidente na redução do número de células presentes na fase S, daí que a região que diz respeito à fase S tenha diminuído a sua área comparativamente ao controlo. Sob um ponto de vista mais alargado, podemos observar ainda que a figura 27 é idêntica à figura do Tamoxifeno a 10 $\mu$ M (figura 27) e é possível equacionar que a Diosgenina 10  $\mu$ M reduza o efeito de Tamoxifeno20 $\mu$ M presente nesta combinação de compostos e que a combinação tenha efeito parecido à solução de Tamoxifeno 10 $\mu$ M isolado. Assim sendo, poderemos equacionar que a Diosgenina tem um efeito antagonista ao do Tamoxifeno.

Na secção III do Anexo presente nesta dissertação encontra-se a tabela dos valores médios da região M1 para cada condição em estudo sendo que esses valores são maiores para as concentrações de Diosgenina50 $\mu$ M e Tamoxifeno20 $\mu$ M (isoladamente). Esses dados apenas nada nos permitem concluir em concreto mas tais informações poderão refletir a presença de uma alteração na estrutura da célula provocada por essas concentrações dos compostos. Relativamente às combinações Diosgenina 50 $\mu$ M+Tamoxifeno 10 $\mu$ M e Diosgenina50 $\mu$ M+Tamoxifeno20 $\mu$ M, após aplicarmos os filtros de análise ('Gating') não foi possível obter número significativo de eventos para que a análise fosse demonstrativa dessas concentrações comparativamente ao controlo. A ausência de um número significativo de eventos para análise, vai de encontro com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular onde a estas concentrações houve diminuição acentuada da proliferação, e no ensaio de microscopia houve também elevada frequência de morte celular (para Diosgenina 50 $\mu$ M+Ta10 $\mu$ M) e ausência de células para análise microscópica (para Diosgenina 50 $\mu$ M+Ta10 $\mu$ M).



## V. Conclusão

O Cancro é uma das principais causas de morte no mundo, tendo enormes consequências negativas para a sociedade. Como tal, é crucial a necessidade de encontrar tratamento (s) eficaz(es) para a sua remissão e/ou prevenção. Neste âmbito, os CM e CP são conhecidos como duas das principais causas de morte por cancro, em todo o mundo. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho consistiu no estudo da potencial ação quimioterapêutica dos compostos Diosgenina, Tamoxifeno e Flutamida em combinação, em linhas celulares de CM e de CP, em diferentes concentrações.

Os resultados evidenciam que:

- A Diosgenina, em concentrações elevadas (50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M) revelou ter um efeito antiproliferativo em ambas as linhas celulares;
- Após exposição das células MCF-7 e LNCaP, aos agentes anticancerígenos Tamoxifeno e Flutamida, respetivamente, verificou-se o efeito antiproliferativo dos mesmos, sendo que a partir de concentrações baixas de Tamoxifeno (15 $\mu$ M) existe uma diminuição clara da proliferação celular das células MCF-7 e após a exposição à Flutamida as células LNCaP vêem a sua proliferação diminuir significativamente apenas a partir de concentrações elevadas (50 $\mu$ M);
- Na combinação de Diosgenina com Tamoxifeno, verificou-se um acentuado efeito na proliferação celular das células MCF-7 quando elevadas concentrações foram utilizadas (Diosgenina 10 $\mu$ M com Tamoxifeno 20 $\mu$ M, Diosgenina 50 $\mu$ M com Tamoxifeno 10 $\mu$ M e Diosgenina 50 $\mu$ M com Tamoxifeno 20 $\mu$ M), assim como uma elevada frequência de morte celular (comprovada apenas para Diosgenina50 $\mu$ M+Tamoxifeno10, por microscopia de fluorescência). Por estudos de citometria de fluxo, observou-se ainda que a Diosgenina 10 $\mu$ M combinada com Tamoxifeno 10 $\mu$ M e com Tamoxifeno 20 $\mu$ M provocou uma alteração na distribuição do ciclo celular, nomeadamente na fase S, o que pode explicar parcialmente o seu potencial efeito antiproliferativo. Ainda neste contexto, foi também interessante observar que a combinação Diosgenina10 $\mu$ M+Tamoxifeno20 $\mu$ M origina uma idêntica distribuição do ciclo celular ao Tamoxifeno10 $\mu$ M, o que nos leva a pensar que nestas condições a Diosgenina poderá reduzir o efeito do Tamoxifeno no ciclo celular. Pela citometria observou-se ainda que a Diosgenina e o Tamoxifeno, isolados, em concentrações elevadas (50 $\mu$ M e 20 $\mu$ M, respetivamente), provavelmente induzem morte celular nas células MCF-7, no entanto, não nos foi possível concluir qual o mecanismo de morte presente quando combinados a essas concentrações. Desta forma, foi possível demonstrar que esta combinação tem efeito citotóxico nestas células e que a sua acção combinada se manifesta, essencialmente, por alteração na distribuição do ciclo celular.
- Nas combinações de Diosgenina com Flutamida, para concentrações mais elevadas da Diosgenina (Diosgenina 50 $\mu$ M com Flutamida 10 $\mu$ M e Diosgenina 50 $\mu$ M com Flutamida 100 $\mu$ M)

existe total inibição da proliferação celular das células LNCaP. Já quando foi adicionada Flutamida à Diosgenina 1 $\mu$ M, a proliferação diminuiu significativamente apenas para a concentração mais elevada de Flutamida; Também foi possível demonstrar que para além da inibição da proliferação das LNCaP, esta combinação poderá induzir morte celular, quando utilizadas concentrações mais elevadas dos referidos compostos.

Desta forma, através do estudo por nós realizado é possível concluir genericamente que as combinações dos compostos em estudo mostram atividade citotóxica, por inibição da proliferação e alteração na distribuição do ciclo celular e ainda por indução de morte celular, nas linhas celulares em estudo quando utilizadas concentrações elevadas. Contudo, não nos pareceu existirem efeitos aditivos nem sinérgicos a destacar.

Como perspectivas de futuro trabalho a desenvolver neste âmbito, são de considerar os seguintes pontos:

- Realização de maior número de experiências em microscopia de fluorescência e em citometria de fluxo, de forma a ter um valor estatístico mais fiável.
- Otimizar o estudo de citometria de fluxo para as células MCF-7 e realizar o mesmo em células LNCaP, a fim de se tirarem conclusões mais significativas acerca do mecanismo de ação resultante da combinação dos compostos.

## VI. Bibliografia

- Alabsi, A. M., Ali, R., Ali, A. M., Al-Dubai, S. A., Harun, H., Abu Kasim, N. H. and Alsalahi, A., Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of gonothalamin in a cancer cell lines. *Asian Pac Journal Cancer Prevention*, **2012**, 13: 5131-5136.
- Amarante-Mendes, G. and Green, D., The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian journal of medical and biological research*, **1999**, 32: 1053-1061.
- Arkin, M., Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Current opinion in chemical biology*, **2005**, 9: 317-324.
- Arnal, J.-F., Fontaine, C., Billon-Galés, A., Favre, J., Laurell, H., Lenfant, F. and Gourdy, P., Estrogen receptors and endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **2010**, 30: 1506-1512.
- Baatout, S. and Derradji, H., Cytometric methods to analyze radiation effects. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, **2004**, 18: 101-105.
- Brodie, A., Lu, Q., Long, B., Fulton, A., Chen, T., Macpherson, N., DeJong, P., Blankenstein, M., Nortier, J. and Slee, P., Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **2001**, 79: 41-47.
- Brodie, A., Njar, V., Macedo, L. F., Sean, V. T. and Sabnis, G., Steroidogenic Enzyme Inhibitors and Hormone Dependent Cancer. *Urologic oncology*, **2009**, 27: 53.
- Butcher, L. D. B., C Richard. Tumor Formation: Number of Mutations Required. *John Wiley & Sons*, **2012**, 2: 7-15.
- Chen, P. S., Shih, Y. W., Huang, H. C. and Cheng, H. W., Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *Public Library of Science*, **2011**, 6: 20-64.
- Corbiere, C., Liagre, B., Bianchi, A., Bordji, K., Dauça, M., Netter, P. and Beneytout, J.-L., 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: 899-905.
- Corbiere, C., Liagre, B., Terro, F. and BENEYTOU, J.-L., Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell research*, **2004**, 14: 188-196.
- Delen, D., Walker, G. and Kadam, A., Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods. *Artificial intelligence in medicine*, **2005**, 34: 113-128.
- Desagher, S. and Martinou, J.-C., Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology*, **2000**, 10: 369-377.
- Farber, E., Cancer development and its natural history a cancer prevention perspective. *Cancer*, **1988**, 62: 1676-1679.
- Foster, I., Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, **2008**, 14: 144-149.
- Freshney, R. I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. *Wiley John & Sons, Incorporated*, **2005**: 365.
- Gao, M., Chen, L., Yu, H., Sun, Q., Kou, J. and Yu, B., Diosgenin down-regulates NF- $\kappa$ B p65/p50 and p38MAPK pathways and attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *International immunopharmacology*, **2013**, 15: 240-245.
- Giovannucci, E., Liu, Y., Platz, E. A., Stampfer, M. J. and Willett, W. C., Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *International Journal of Cancer*, **2007**, 121: 1571-1578.
- Gomes Cornélio, A. L., Salles, L. P., Campos da Paz, M., Cirelli, J. A., Guerreiro-Tanomaru, J. M. and Tanomaru Filho, M., Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *Journal of Endodontics*, **2011**, 37: 203-210.
- Grann, V. R., Troxel, A. B., Zojwalla, N. J., Jacobson, J. S., Hershman, D. and Neugut, A. I., Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer*, **2005**, 103: 2241-2251.
- Grivicich, I., Regner, A. and Rocha, A. B. d., Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*, **2007**, 53: 335-343.

- Hanahan, D. and Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**, 144: 646-674.
- Haque, R., Ahmed, S. A., Fisher, A., Avila, C. C., Shi, J., Guo, A., Craig Cheetham, T. and Schottinger, J. E., Effectiveness of aromatase inhibitors and tamoxifen in reducing subsequent breast cancer. *Cancer Medicine*, **2012**, 1: 318-327.
- Harvey JM, C. G., Osborne CK, Alfred DC. Estrogen receptor status by binding by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **1999**, 17: 1474-1481.
- Heinlein, C. A. and Chang, C., Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews*, **2004**, 25: 276-308.
- Henderson, B., Ross, R. and Bernstein, L., Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer research*, **1988**, 48: 246-253.
- Henderson, B. E. and Feigelson, H. S., Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **2000**, 21: 427-433.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S. and Chandrasekharan, S., Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology*, **2007**, 8: 165.
- Hess-Wilson, J. and Knudsen, K., Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. *Cancer letters*, **2006**, 241: 1-12.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A. and Murphy, G. P., LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research*, **1983**, 43: 1809-1818.
- Huss, W. J., Gray, D. R., Werdin, E. S., Funkhouser, W. K. and Smith, G. J., Evidence of pluripotent human prostate stem cells in a human prostate primary xenograft model. *The Prostate*, **2004**, 60: 77-90.
- Ichikawa, A., Ando, J. and Suda, K., G1 arrest and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in tamoxifen-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Human cell*, **2008**, 21: 28-37.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D., Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, **2011**, 61: 69-90.
- Jiang, Y., Palma, J. F., Agus, D. B., Wang, Y. and Gross, M. E., Detection of androgen receptor mutations in circulating tumor cells in castration-resistant prostate cancer. *Clinical chemistry*, **2010**, 56: 1492-1495.
- Karn, A., Jha, A., Shrestha, S., Acharya, B., Poudel, S. and Bhandari, R., Tamoxifen for breast cancer. *Journal Nepal Medical Association*, **2010**, 49: 62-67.
- Kawabata, W., Suzuki, T., Moriya, T., Fujimori, K., Naganuma, H., Inoue, S., Kinouchi, Y., Kameyama, K., Takami, H. and Shimosegawa, T., Estrogen Receptors (alpha and beta) and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and 2 in Thyroid Disorders: Possible In Situ Estrogen Synthesis and Actions. *Modern pathology*, **2003**, 16: 437-444.
- Kelly, K. and Yin, J. J., Prostate cancer and metastasis initiating stem cells. *Cell research*, **2008**, 18: 528-537.
- Kijima, I., Itoh, T. and Chen, S., Growth inhibition of estrogen receptor-positive and aromatase-positive human breast cancer cells in monolayer and spheroid cultures by letrozole, anastrozole, and tamoxifen. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **2005**, 97: 360-368.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P. and Green, D., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, **2008**, 16: 3-11.
- Lee, Y.-C., Lin, J.-T., Wang, C.-K., Chen, C.-H. and Yang, D.-J., Antiproliferative effects of fractions of furostanol and spirostanol glycosides from yam (*dioscorea pseudojaponica* yamamoto) and diosgenin on cancer and normal cells and their apoptotic effects for MCF-7 cells. *Journal of Food Biochemistry*, **2010**.
- Lee, Y.-C., Lin, J.-T., Wang, C.-K., Chen, C.-H. and Yang, D.-J., Antiproliferative effects of fractions of furostanol and spirostanol glycosides from yam (*dioscorea pseudojaponica* yamamoto) and diosgenin on cancer and normal cells and their apoptotic effects for MCF-7 cells. *Journal of Food Biochemistry*, **2012**, 36: 75-85.

- Lepage, C., Liagre, B., Cook-Moreau, J., Pinon, A. and Beneytout, J.-L., Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways in diosgenin-induced apoptosis in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells. *International journal of oncology*, **2010**, 36: 1183-1191.
- Li, F., Fernandez, P. P., Rajendran, P., Hui, K. M. and Sethi, G., Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer letters*, **2010**, 292: 197-207.
- LI, J., LIU, X., GUO, M., LIU, Y., LIU, S. and YAO, S., Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of diosgenin. *Analytical sciences*, **2005**, 21: 561-564.
- Long, R. M., Morrissey, C., Fitzpatrick, J. M. and Watson, R. W. G., Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clinical Science*, **2005**, 108: 1-12.
- LPCC. *Liga Portuguesa Contra o Cancro*, **2013**, Consultado em Março de 2013.
- Mai, Z., Blackburn, G. L. and Zhou, J.-R., Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. *Carcinogenesis*, **2007**, 28: 1217-1223.
- Mareel, M. and Leroy, A., Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Science Signalling*, **2003**, 83: 337.
- Marona, H. R. N., Storti, M. P. B. and Neto, V. A. D. L., Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, **2004**, 50: 37-44.
- Menendez, J. A., Vellon, L., Colomer, R. and 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.
- Mesnil, M., Yamasaki, H., Balmain, A., Barrett, J. C. and Moses, H., Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: Evidence and hypothesis. *Molecular carcinogenesis*, **2006**, 7: 14-17.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **1983**, 65: 55-63.
- Mufudza, C., Sorofa, W. and Chiyaka, E. T., Assessing the Effects of Estrogen on the Dynamics of Breast Cancer. *Computational and mathematical methods in medicine*, **2012**, 2012: 473-572.
- Nilsson, U. W., Jönsson, J. A. and Dabrosin, C., Tamoxifen decreases extracellular TGF- $\beta$ 1 secreted from breast cancer cells—a post-translational regulation involving matrix metalloproteinase activity. *Experimental cell research*, **2009**, 315: 1-9.
- Nunes, P., Pimentel, F. L., Pina, F., Rolo, F. and KeyPoint, C. C., Registo Nacional de Cancro da Próstata, em Portugal-ReNaCaP. *Acta Urologica*, **2010**, 3: 39-45.
- OMS. *Organização Mundial de Saúde*, **2013**, Consultado em Março de 2013.
- Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V. and Patel, D. K., A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Natural Products and Bioprospecting*, **2012**, 2: 46-52.
- Perez, E., Safety profiles of tamoxifen and the aromatase inhibitors in adjuvant therapy of hormone-responsive early breast cancer. *Annals of Oncology*, **2007**, 18: 26-35.
- Perry, A. R., Oncogenes. *Oncol lett.*, **2001**, 3: 32-41.
- Perry, R. R. and Greaves, B., Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and-independent human breast cancer cells. *Annals of surgical Oncology*, **1995**, 2: 238-245.
- Podolak, I., Galanty, A. and Sobolewska, D., Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, **2010**, 9: 425-474.
- Powles, T. J., Hickish, T., Kanis, J. A., Tidy, A. and Ashley, S., Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *Journal of Clinical Oncology*, **1996**, 14: 78-84.
- Raju, J. and Bird, R. P., 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.

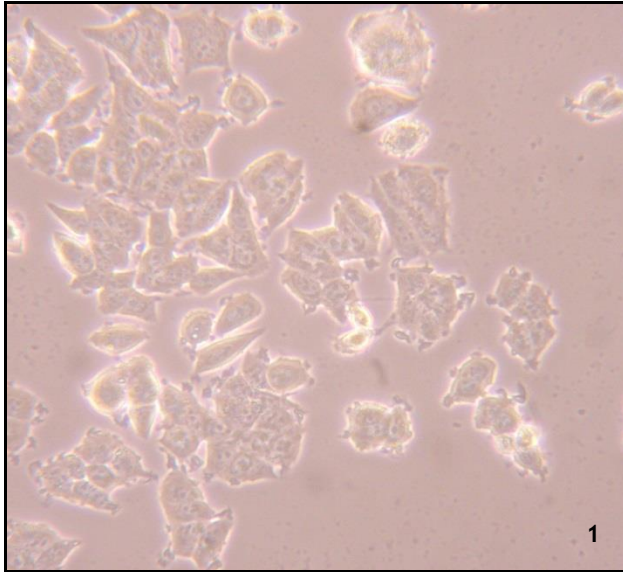
- Raju, J. and Rao, C. V., Diosgenin, a Steroid Saponin Constituent of Yams and Fenugreek: Emerging Evidence for Applications in Medicine. *Natural Products Bioprospect*, **2011**, 2: 46-52.
- Sá, A. C., Coelho, C. M., Moura, F., Monsanto, F. and Machado, C., A interdisciplinaridade das tecnologias da saúde no diagnóstico e no tratamento de tumores de mama: estudo de caso. *Saúde & Tecnologia*, **2012**, T: 5-8.
- Schröder, F., Antiandrogens as monotherapy for prostate cancer. *European urology*, **1998**, 34: 12-17.
- Semi, K., Matsuda, Y., Ohnishi, K. and Yamada, Y., Cellular reprogramming and cancer development. *International Journal of Cancer*, **2013**, 132: 1240-1248.
- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G. and Jiang, Y., Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *Journal of medicinal food*, **2004**, 7: 67-78.
- Shi, Y., Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, **2002**, 9: 459-470.
- Singh, M. S., Francis, P. A. and Michael, M., Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. *The Breast*, **2011**, 20: 111-118.
- Small, E. J., Baron, A. D., Fippin, L. and Apodaca, D., Ketoconazole retains activity in advanced prostate cancer patients with progression despite flutamide withdrawal. *The Journal of urology*, **1997**, 157: 1204-1207.
- Soifer, H. S., Souleimanian, N., Wu, S., Voskresenskiy, A. M., Collak, F. K., Cinar, B. and Stein, C. A., Direct regulation of androgen receptor activity by potent CYP17 inhibitors in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, **2012**, 287: 3777-3787.
- Sowmyalakshmi, S., Ranga, R., Gary Gairola, C. and Chendil, D., Effect of diosgenin (fenugreek) on breast cancer cells. *Amercian association for cancer research*, **2005**, 46: 1382.
- Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., Venguswamy, G., Kyprianou, N. and Damodaran, C., Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, **2009**, 125: 961-967.
- Stanbrough, M., Bubley, G. J., Ross, K., Golub, T. R., Rubin, M. A., Penning, T. M., Febbo, P. G. and Balk, S. P., Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer research*, **2006**, 66: 2815-2825.
- Starlard-Davenport, A., Tryndyak, V. P., James, S. R., Karpf, A. R., Latendresse, J. R., Beland, F. A. and Pogribny, I. P., Mechanisms of epigenetic silencing of the *Rassf1a* gene during estrogen-induced breast carcinogenesis in ACI rats. *Carcinogenesis*, **2010**, 31: 376-381.
- Su, Y., Shankar, K., Rahal, O. and Simmen, R., Bidirectional signaling of mammary epithelium and stroma: implications for breast cancer—preventive actions of dietary factors. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2011**, 22: 605-611.
- Takahashi, A., Matsumoto, H., Yuki, K., Yasumoto, J.-I., Kajiwara, A., Aoki, M., Furusawa, Y., Ohnishi, K. and Ohnishi, T., High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. *International Journal of Radiation Oncology*, **2004**, 60: 591-597.
- Tammela, T., Endocrine treatment of prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **2004**, 92: 287-295.
- Temel, R. E., Brown, J. M., Ma, Y., Tang, W., Rudel, L. L., Ioannou, Y. A., Davies, J. P. and Yu, L., Diosgenin stimulation of fecal cholesterol excretion in mice is not NPC1L1 dependent. *Journal of lipid research*, **2009**, 50: 915-923.
- Uemura, T., Hirai, S., Mizoguchi, N., Goto, T., Lee, J. Y., Taketani, K., Nakano, Y., Shono, J., Hoshino, S. and Tsuge, N., Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues. *Molecular nutrition & food research*, **2010**, 54: 1596-1608.
- Vermes, I., Haanen, C. and Reutelingsperger, C., Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*, **2000**, 243: 167-190.
- Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A. and Gruppen, H., Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, **2007**, 68: 275-297.
- Wang, T. T. and Phang, J. M., Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer research*, **1995**, 55: 2487-2489.

- Wang, Y.-J., Pan, K.-L., Hsieh, T.-C., Chang, T.-Y., Lin, W.-H. and Hsu, J. T.-A., Diosgenin, a plant-derived sapogenin, exhibits antiviral activity in vitro against hepatitis C virus. *Journal of nature products*, **2011**, 74: 580-584.
- Xu, L., Liu, Y., Wang, T., Qi, Y., Han, X., Xu, Y., Peng, J. and Tang, X., Development and validation of a sensitive and rapid non-aqueous LC-ESI-MS/MS method for measurement of diosgenin in the plasma of normal and hyperlipidemic rats: A comparative study. *Journal of Chromatography B*, **2009**, 877: 1530-1536.
- Yan, S.-C., Liu, Y.-P., Zhang, L.-Y., Qu, J.-L., Xu, L., Liu, J., Zhang, Y., Hou, K.-Z., Teng, Y.-E. and Qu, X.-J., Ubiquitin ligase c-Cbl is involved in tamoxifen-induced apoptosis of MCF-7 cells by downregulating the survival signals. *Acta Oncologica*, **2011**, 50: 693-699.
- Zhu, M.-L. and Kyprianou, N., Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *The FASEB Journal*, **2010**, 24: 769-777.

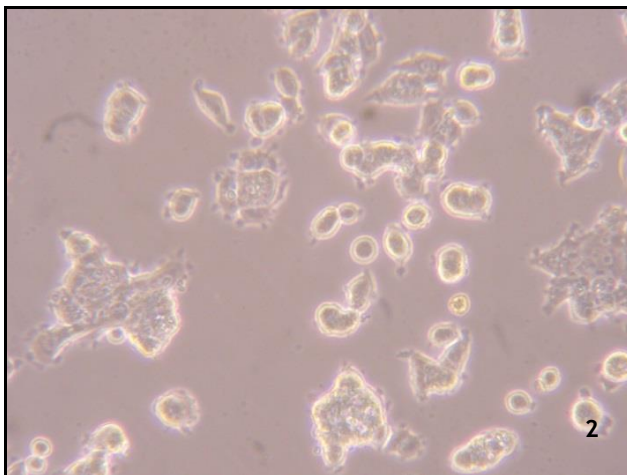


# Anexo

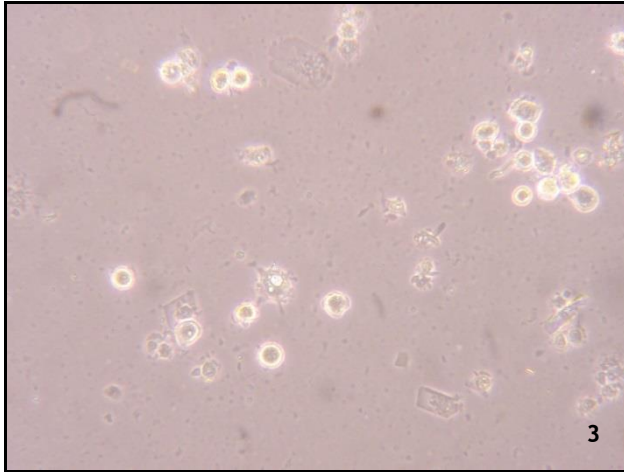
I - Fotografias relativas às células MCF-7 após 48h de exposição aos compostos em estudo diluídos em meio DMEM, suplementado com soro (FBS). Controlo, diz respeito às células que não foram expostas ao composto. (Ampliação de 20X - microscópio Olympus CKX 41, acoplado com uma máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ).



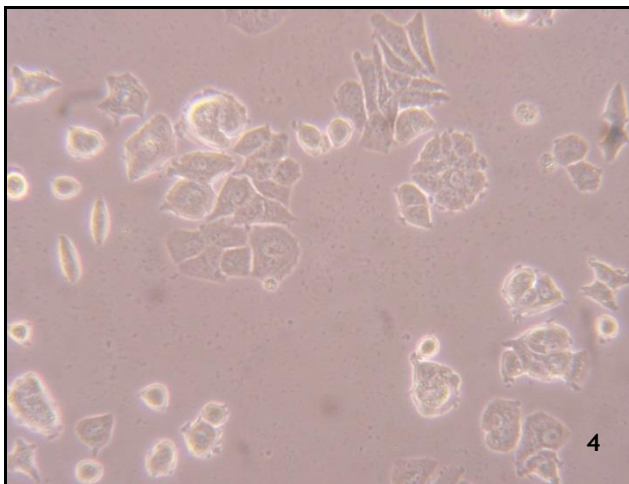
1: Controlo (sem composto)



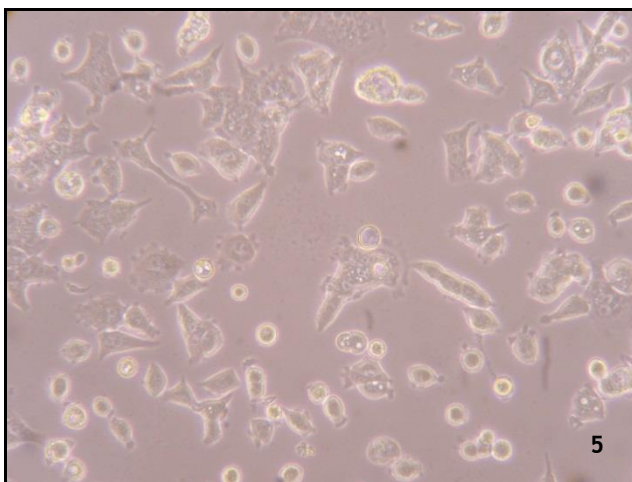
2: Exposição a Diosgenina 10µM - é visível uma alteração na morfologia das células, apresentando aspeto arredondado, após 48h de exposição;



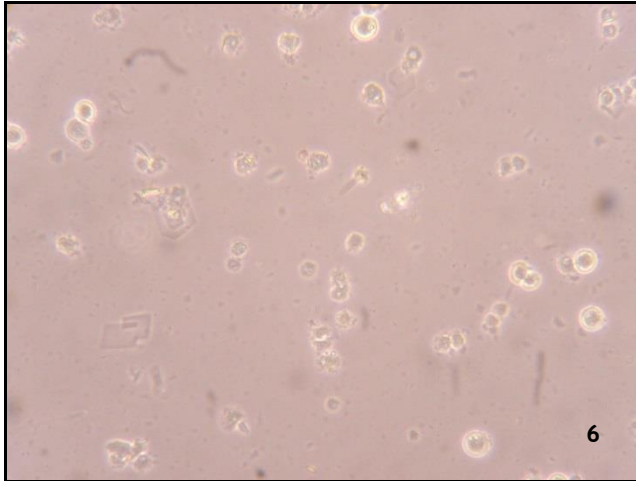
3: Exposição a Diosgenina 50µM - é notória uma completa alteração na morfologia e tamanho das células.



4: Exposição a Tamoxifeno 10µM - observa-se que as células começam a adquirir forma arredondada.

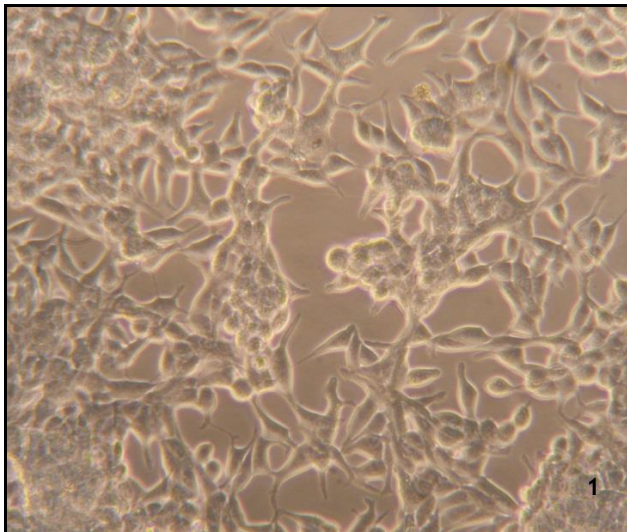


5: Exposição a Diosgenina 10µM + Tamoxifeno 10µM - é visível que certas células adquirem aspeto arredondado;

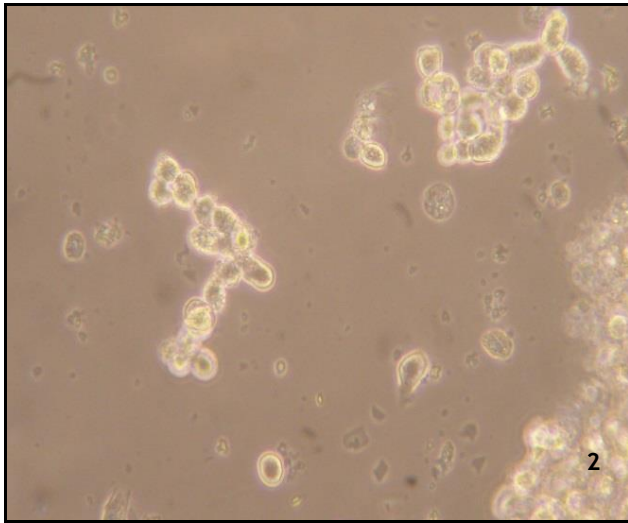


6: Exposição a Diosgenina 50µM + Tamoxifeno 10µM - todas as células apresentam a sua morfologia alterada, tamanho reduzido.

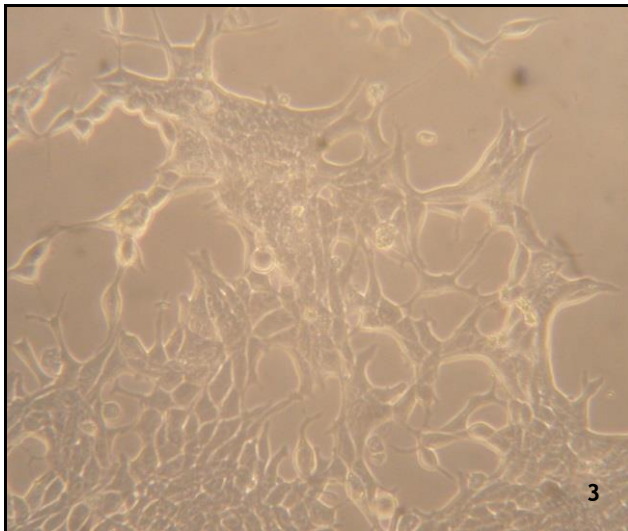
II - Fotografias relativas às células LNCaP após 48h de exposição aos compostos em estudo diluídos em meio RPMI 1640, suplementado com soro (FBS). Controlo - diz respeito às células que não foram expostas a qualquer tratamento. (Ampliação de 20X - microscópio Olympus CKX 41, acoplado com uma máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ).



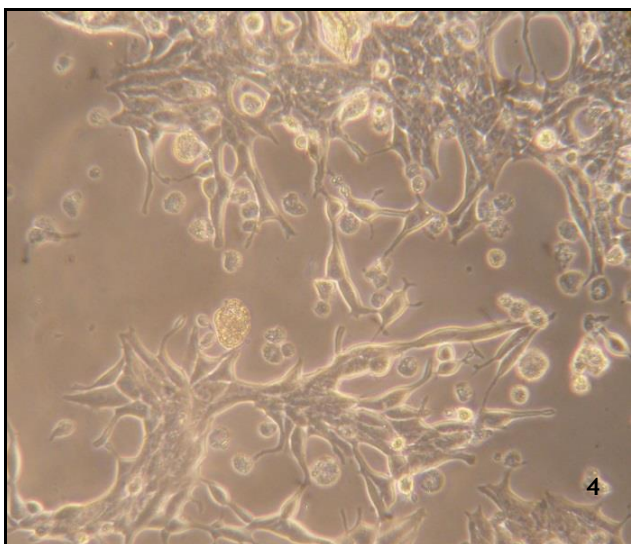
1: Controlo LNCaP



2: Exposição a Diosgenina 50µM - é evidente uma completa alteração da morfologia celular.



3: Exposição a Flutamida 50µM - sem alterações morfológicas significativas observáveis ao microscópio.



4: Exposição a Flutamida 100 $\mu$ M - observam-se alterações a nível morfológico em algumas células com aspeto arredondado e tamanho reduzido.

III- Tabela da média das percentagens do número de eventos na fase M1 adquiridos por citometria.

Tratamento (nas MCF-7)	% de eventos da região M1		Média(%)
Controlo	2,38	8,73	5,555
Diosgenina 10 ( $\mu$ M)	6,1	8,35	7,225
Diosgenina 50( $\mu$ M)	29,82	51,88	40,85
Tamoxifeno 10( $\mu$ M)	11,2	6,31	8,755
Tamoxifeno 20( $\mu$ M)	3,81	5,72	4,765
Diosgenina 10+Tamoxifeno 10( $\mu$ M)	4,23	3,91	4,07
Diosgenina 10+Tamoxifeno 20( $\mu$ M)	21,73	13,57	17,65
Diosgenina 50+Tamoxifeno 10( $\mu$ M)	38,78	55,87	47,325
Diosgenina 50+Tamoxifeno 20( $\mu$ M)	44,73	63,59	54,16