



Universidade de Évora

Departamento de Química

Mestrado em Bioquímica

Estudo da actividade biológica de extractos de *Cynara cardunculus* na regulação do ciclo celular, utilizando células de hepatocarcinoma humano

Dissertação

Filipa Trindade Santana Albuquerque da Costa

Orientadores: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira (Universidade de Évora)

Doutora Maria de Fátima Pereira Duarte (Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral)

**Évora
2010**

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Teresa Caldeira, Doutora Fátima Duarte e Doutora Teresa Silva Lopes pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão, dedicação e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Aos investigadores do CEBAL, pela amizade, disponibilidade, apoio e incentivo sempre demonstrados no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais e à minha irmã por toda a ajuda, pela compreensão, apoio e incentivo que sempre me transmitiram.

Aos meus amigos, em especial à Ana Faleiro e ao Gonçalo Lourenço, agradeço o apoio e a amizade manifestados ao longo deste trabalho.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	I
Índice de Tabelas.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
I - Revisão Monográfica.....	1
1. Oncobiologia.....	2
2. Carcinoma Hepatocelular.....	3
2.1. Epidemiologia do carcinoma hepatocelular.....	3
2.1.1. Incidência.....	3
2.1.2. Factores de risco.....	4
2.1.2.1. Hepatite crónica.....	4
2.1.2.2. Cirrose hepática.....	5
2.1.2.3. HBV e HCV.....	6
2.1.2.4. Consumo de álcool e de tabaco.....	7
2.1.2.5. Aflotoxina.....	7
2.1.2.6. Drogas hepatotóxicas e químicos.....	7
2.1.2.7. Doenças genéticas e hepáticas.....	8
2.2. Terapêutica.....	8
2.2.1. Recessão cirúrgica.....	9
2.2.2. Transplante hepático.....	9
2.2.3. Ablação percutânea.....	10
2.2.4. Quimioembolização transarterial/ embolização arterial transcateter.....	10
2.3. Não resposta terapêutica.....	11
2.3.1. Mecanismos moleculares de hepatocarcinogenese.....	12
2.4. Ciclo celular.....	14
2.4.1. Proteínas Cip/Kip como inibidores do ciclo celular.....	16
2.4.2. Função e regulação do p21 ^{CIP1/WAF1}	17
2.4.3. Função e regulação do p27 ^{KIP1}	18
2.4.4. p27 ^{KIP1} como factor de prognóstico de HCC.....	19
3. Cancro da mama.....	20
3.1. Factores de risco.....	21
3.1.1. Peso.....	21

3.1.2. Dieta.....	21
3.1.3. Consumo de álcool e de tabaco.....	21
3.1.4. Exposição ao estrogénio.....	22
3.1.5. Uso de contraceptivos orais.....	22
4. Fitoterapia.....	21
4.1. Vias múltiplas de sinalização conduzem à resistência à quimioterapia e radioterapia.....	23
4.1.1. Expressão de intermediários reactivos de oxigénio.....	23
4.1.2. A activação de NF-κB.....	23
4.1.3. Expressão do COX-2.....	24
4.1.4. Expressão do bcl-2.....	24
4.1.5. Expressão da survivina.....	24
4.2. Polifenóis de algumas plantas utilizados em fitoterapia.....	25
5. <i>Cynara cardunculus</i>	27
5.1. Ciclo de crescimento da <i>Cynara cardunculus</i>	27
5.2. Constituintes biologicamente activos.....	28
6. Problemática.....	30
7. Finalidade.....	31
8. Objectivos Gerais.....	31
9. Objectivos Específicos.....	31
II – Materiais e Métodos.....	33
1. Materiais.....	34
1.1. Linha celular e cultura.....	34
2. Métodos.....	34
2.1. Determinação do valor de IC ₅₀ para o extracto de FCF na proliferação celular de células HepG2.....	34
2.2. Extração do RNA.....	35
2.3. Síntese de cDNA.....	35
2.4. Amplificação do cDNA por PCR com os primers específicos para os marcadores p21 ^{CIP1/WAF1} e p27 ^{KIP1}	35
2.5. Citometria de fluxo.....	36
III - Resultados e Discussão.....	37
1. Caracterização dos compostos fenólicos presentes em vários órgãos da <i>Cynara cardunculus</i>	38
2. Efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco na proliferação de células HepG2.....	41
3. Efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco da expressão de p21 ^{CIP1/WAF1} e p27 ^{KIP1} em células HepG2 e MDA-MB 231.....	42
4. Efeito do extracto FCF na análise do ciclo celular de HepG2 por citometria	

de fluxo.....	45
4.1. Optimização da análise do ciclo celular utilizando linhas de células HepG2.....	45
4.2. Análise fluorocitométrica do efeito dos extractos na distribuição ciclo celular.....	46
5. Considerações finais.....	53
6. Perspectivas futuras.....	54
IV - Referências bibliográficas.....	55
V – Anexos.....	57
Anexo I.....	57
Anexo II.....	60
Anexo III.....	62
Anexo IV.....	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Variações regionais da taxa de mortalidade de HCC (El-Serag and Rudolph 2007)....4	4
Figura 2 - Sequência cronológica das lesões celulares que culminam no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.....12	12
Figura 3 - A progressão do ciclo celular é regulada por complexos ciclina-CDK (Park 2009).....15	15
Figura 4 - Proteínas Cip/Kip regulam os complexos ciclina CDK no citoplasma (Coqueret 2003).....17	17
Figura 5 - Moléculas celulares implicadas na resistência à quimioterapia e radioterapia. PDGFR, receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas (Garg, Buchholz et al. 2005).....22	22
Figura 6 - A quimioterapia e a radioterapia induzem tanto sinalização pro-apoptótica, conduzindo a célula à morte e sensibilidade ao tratamento, como sinalização anti-apoptótica, conferindo à célula resistência ao tratamento. (Garg, Buchholz et al. 2005).....25	25
Figura 7 - Concentração total, em peso seco, de fenóis e de flavanóis presentes em vários órgãos de <i>Cynara cardunculus</i>38	38
Figura 8 - Efeito das diferentes concentrações do extracto de folha de cardo cultivado fresco (FCF), 50-500 µg/ml, na proliferação das células HepG2.....39	39
Figura 9 – Imagens de células HepG2 em cultura de monocamada obtidos no microscópio óptico invertido à ampliação de 100x.....40	40
Figura 10 - Curva de viabilidade celular em células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de extracto de folha de cardo cultivado fresco.....41	41
Figura 11 – Níveis de expressão para os genes p21 ^{CIP1/WAF1} e p27 ^{KIP1} em células HepG2 incubadas durante 48h na presença de diferentes concentrações de extractos de cardo.....41	41
Figura 12 - Análise densiométrica da expressão dos genes p21 ^{CIP1/WAF1} e p27 ^{KIP1} nas células HepG2 tratadas com os extractos CCF, FCF e controlo.....43	43
Figura 13 - Níveis de expressão para os genes p21 ^{CIP1/WAF1} e p27 ^{KIP1} em células MDA-MB 231 incubadas durante 48h na presença de diferentes concentrações em fenóis de extracto de folhas de cardo cultivado fresco (FCF).....44	44
Figura 14 - Análise densiométrica da expressão dos genes p21 ^{CIP1/WAF1} e p27 ^{KIP1} nas células MDA-MB 231 tratadas com o extracto FCF e controlo.....44	44

Figura 15 – Gráficos de densidades representativos dos núcleos das células HepG2 (controlo) em diferentes níveis de fluorescência.....	45
Figura 16 – Histogramas de fluorescência representativos da citometria de fluxo de células tumorais HepG2 não tratadas (controlo) e de células tratadas com diferentes concentrações de extracto.....	46
Figura 17 - Efeito do extracto metanólico da folha de cardo cultivado fresco na distribuição do ciclo celular das células HepG2.....	46
Figura 18 – Gráficos de densidades dos núcleos das células HepG2 após o tratamento com diferentes concentrações em peso seco do extracto de folha de cardo cultivado fresco.....	48
Figura 19 - Histogramas de fluorescência representativos da citometria de fluxo de células tumorais MDA-MB-231.....	49
Figura 20 – Gráfico representativo do efeito do extracto metanólico da folha de cardo cultivado fresco na distribuição do ciclo celular das células MDA-MB 231.....	50
Figura 21 - Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular das células MDA-MB 231, incubadas com o extracto de folha de cardo cultivado fresco, com as concentrações de 0,5; 0,74 e 1µg/ml	51
Figura 22 – Gráficos de densidades dos núcleos das células MDA-MB após o tratamento com diferentes concentrações em compostos fenólicos do extracto de folha de cardo cultivado fresco.....	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição percentual do número total de células tumorais HepG2 submetidas a apoptose (sub-G ₁) e em diferentes fases do ciclo celular, tratadas com três tipos de concentrações em peso seco de extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco (100; 150 e 200 µg/mL).....	47
Tabela 2 - Distribuição percentual do número total de células tumorais MDA-MB-231 submetidas a apoptose (sub-G ₁) e em diferentes fases do ciclo celular, tratadas com três tipos de concentrações em compostos fenólicos de extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco (0,5; 0,74 e 1 µg/mL).....	50
Tabela 3 - Percentagem de citotoxicidade das células HepG2.....	62
Tabela 4 – Percentagem de viabilidade celular das células HepG2.....	62
Tabela 5 - Cálculo do IC ₅₀ das células HepG2.....	62

Abreviaturas

AFB1 – Aflotoxina B1
CC – Citocinas
CDK – Citocinas dependentes de cinases
cDna – DNA cíclico
CO₂ – Dióxido de carbono
COX-2 – Ciclooxygenase - 2
CXC - Quimiocinas
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - Desoxinucleótidos do DNA
FL – Detector de fluorescência do citómetro de fluxo
HBx – Proteína X
HBV – Vírus da hepatite B
HCC – carcinoma hepatocelular
HCV – Vírus da hepatite C
HepG2 – células de hepatocarcinoma humano
MDA-MB-231 – células de adenocarcinoma mamário
mRNA – RNA mensageiro
NF-κB – Factor nuclear κB
PBS – tampão fosfato
PCR – Polimerase chain reaction
PI-3K - fosfatidilinositol 3-cinase
pRb – Proteína do retinoblastoma
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reactivas de oxigénio
rpm – Rotações por minuto
RT-PCR – Real-Time Polimerase Chain Reaction
TGF-β - factor de crescimento transformante β
TNF α – Factor de necrose tumoral α
TNF1 – Factor de necrose tumoral 1

Resumo

O carcinoma hepatocelular trata-se de um tipo de tumor altamente maligno, com uma previsão média de vida muito reduzida, em que os tratamentos disponíveis são restritos e alguns são pouco eficazes. O cancro da mama é um tumor maligno que se desenvolve nas células do tecido mamário, possuindo maiores hipóteses de cura quando é detectado no início.

É necessário o desenvolvimento de novas terapias onde a prevenção poderá ser um tratamento adjuvante. A planta *Cynara cardunculus*, vulgarmente designada por cardo, encerra em si um manancial de diferentes compostos bioactivos nomeadamente flavenóides e a cinarina. Uma propriedade proeminente destes fitonutrientes é a sua capacidade antioxidante, oncoprotectora e hepatoprotectora.

Neste trabalho escolheu-se o extracto de folha de cardo cultivada fresca, pois possui uma maior concentração em compostos fenólicos. Em relação aos resultados obtidos por RT-PCR observou-se um aumento da expressão do gene p21^{CIP1/WAF1}, em células HepG2, e em células MDA-MB 231 houve um aumento da expressão do gene p27^{KIP1}, em células incubadas com o extracto. De acordo com resultados obtidos por citometria de fluxo, constatou-se que ambas linhas celulares, que foram incubadas com o mesmo extracto, tiveram um aumento da fase G1 e uma diminuição das fases S e G2.

Abstract

The hepatocellular carcinoma (HCC), one of the most common cancers worldwide, is often diagnosed at an advanced stage when most potentially curative therapies are of limited efficacy. Therefore, the development of more effective therapeutic tools and strategies is much needed. In this context several phytochemicals already have a recognized oncoprotective as well as antitumoral role due to their phytochemical properties.

The biologically active constituents of *Cynara Cardunculus* are phenolic compounds, among them the flavonoids and the dicaffeoylquinic acids. One prominent characteristic of these fitonutrients is their antioxidant capacity, oncoprotective and hepatoprotective activity.

On this present work, the fresh cardoon cultivated leaves were chosen, because it possess a higher concentration of phenols. The RT-PCR results reveals that the expression of the gene p21^{CIP1/WAF1} was higher in HepG2 cells and in the MDA-MB 231 cells the expression of the gene p27^{KIP1} was higher. The results from the flow cytometry reveals that both cell lines, incubated with the same extract, had a much higher percentage of cells on the G₀/G₁ phase and a decrease on the S and G₂/M phase.

I - Revisão Monográfica

1 - Oncobiologia

A Oncobiologia tem como objectivo dar a conhecer o processo oncogénico que resulta do desequilíbrio funcional dos mecanismos de regulação responsáveis pela homeostase celular. Em consequência desse desequilíbrio, surge uma proliferação celular indiscriminada formadora de tumores que evoluem gradualmente para malignidade, isto é, para cancro. Assim, são evidenciadas as vias gerais de sinalização celular e as vias especializadas para indução de proliferação celular, o ciclo celular e sua regulação e, finalmente, os mecanismos moleculares do processo oncogénico e perspectivas para a sua prevenção e terapia.

Nos últimos anos têm havido avanços significativos na compreensão dos conceitos fundamentais da oncogenese. Porventura, a mais importante é a crescente valorização do papel crítico da proliferação celular sem limitações no processo de carcinogenese (Roberts and Gores 2005). O cancro possui um fenótipo complexo, sugerindo uma aquisição de múltiplas sequências genéticas e alterações epigenéticas durante a carcinogenese. Actualmente, o paradigma dominante sugere que a carcinogenese ocorre através de um processo de vários passos, resultando na progressão de células normais através de fases pré-neoplásicas em cancros invasivos (Coleman 2003). Eventualmente a acumulação de uma combinação crítica de alterações num conjunto distinto de vias, torna-se suficiente para desregular os mecanismos normais de homeostase, que regulam o crescimento celular e o fenótipo do cancro (Hemalswarya and Doble 2006).

As características fenotípicas chave das células cancerígenas são a auto-suficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, a evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, a continuação da angiogenese, e a invasão e metástase. A aquisição destas características fenotípicas é necessária para o eventual desenvolvimento do fenótipo neoplásico completo. Além disso, é de salientar que é cada vez mais claro que o evento celular predominante necessário para o desenvolvimento do cancro é a proliferação celular ilimitada. Isto depende do equilíbrio entre a actividade do crescimento celular e das vias de sinalização apoptótica, que são interdependentes. Consequentemente, várias moléculas oncogénicas que promovem a proliferação celular também induzem a apoptose, para que eles tenham a capacidade homeostática de limitar os seus efeitos proliferativos. A ruptura deste mecanismo homeostático inato pela inibição dos programas pró-apoptóticos normalmente induzidos pelas moléculas oncogénicas, pode ser o segundo ponto que permite a proliferação não regulada.

O carcinoma hepatocelular (HCC) trata-se de um tipo de tumor altamente maligno, com uma previsão média de vida muito reduzida, em que os tratamentos disponíveis, nomeadamente transplante hepático, cirurgia seguida de quimioterapia são

relativamente pouco eficazes (Feitelson, Sun et al. 2002; Coleman 2003). Sendo necessário o desenvolvimento de novas terapias onde a prevenção parece ser um tratamento adjuvante com especial relevo. É neste contexto que muitos compostos fitoquímicos têm já uma reconhecida função oncoprotectora, devido às suas propriedades farmacológicas (Roberts and Gores 2005; Hemalswarya and Doble 2006).

Portanto, o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e de novas estratégias de tratamento é necessário. Os carcinomas hepatocelulares são fenotipicamente e geneticamente tumores heterogéneo. Todavia, apesar da sua heterogenicidade, recentes estudos sobre a biologia do carcinoma hepatocelular sugerem que certas vias de sinalização e alterações moleculares parecem ter um papel essencial no desenvolvimento do HCC pela promoção do crescimento celular e a sua sobrevivência (Semela and Dufour 2004; Avila, Berasain et al. 2006).

2. Carcinoma hepatocelular

2.1. Epidemiologia do carcinoma hepatocelular

2.1.1. Incidência

A incidência do carcinoma hepatocelular (HCC) em países em vias de desenvolvimento é 2 a 3 vezes maior do que em países desenvolvidos (Bruix, Sherman et al. 2001). A Figura 1 mostra a distribuição desta patologia a nível mundial.

A maioria dos casos do HCC, aproximadamente 80%, ocorre na África subsaariana e na Ásia Oriental. A China possui mais do que 50% dos casos mundiais (El-Serag and Rudolph 2007). A América do Norte e do Sul, Europa do Norte e Oceânia possuem uma taxa reduzida se áreas afectadas por HCC (aproximadamente 5/100,000) (El-Serag and Rudolph 2007). Taxas tipicamente reduzidas de incidência são registadas no Canadá (homens 3,2/100,000; mulheres 1,1/100,000), Colômbia (homens 2,2/100,000; mulheres 2,0/100,000), Reino Unido (homens 2,2/100,000; mulheres 1,1/100,000) e Austrália (homens 2,2/100 000; mulheres 1,0/100 000) (El-Serag and Rudolph 2007). Nos países do sul da Europa, são tipificados por taxas em Espanha (homens 7,5/100 000; mulheres 2,4/100 000), Itália (homens 13,5/ 100 000; 4,6/100 000) e a Grécia (homens 12,1/100 000; mulheres 4,6/100 000) (El-Serag and Rudolph 2007).

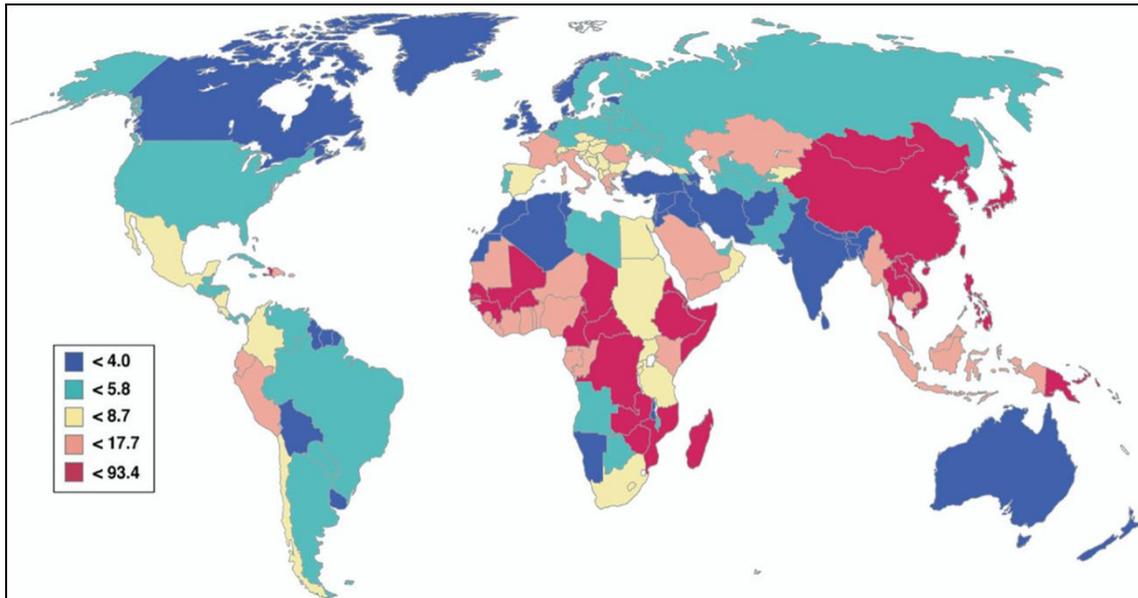


Figura 1 - Variações regionais da taxa de mortalidade de HCC (El-Serag and Rudolph 2007). (taxa de incidência idade estandarizada: homens 35,2/100,000; mulheres 13,3/100,000).

2.1.2. Factores de risco

O carcinoma hepatocelular invulgar pois pode ocorrer em indivíduos com historial de patologias do foro hepático, como por exemplo doenças crónicas do fígado e cirrose (cerca de 70%-90% dos casos detectados de HCC). A maioria das causas de cirrose em doentes com HCC inclui a hepatite B, hepatite C, doença alcoólica do fígado e possivelmente esteato-hepatite não alcoólica (El-Serag and Rudolph 2007; Shariff MI 2009). As causas menos vulgares incluem a hemocromatose hereditária, deficiência em α -1 anti-tripsina, hepatite auto-imune e algumas porfírias (El-Serag and Rudolph 2007).

2.1.2.1. Hepatite crónica

A hepatite crónica é uma condição inflamatória prolongada do fígado que é caracterizada pela presença de células inflamatórias infiltradas, necrose dos hepatócitos e morte, e uma acelerada proliferação de hepatócitos residuais para substituírem as células mortas devido às lesões. As células inflamatórias da hepatite crónica consistem de uma mistura de linfócitos B e T, células dendríticas, células plasmáticas e macrófagos (Coleman 2003; Shariff MI 2009). Estas células infiltram o tecido conjuntivo e também podem invadir o parênquima lobular adjacente. Os linfócitos e os macrófagos acumulam-se no fígado cronicamente inflamado, como resultado do aumento da expressão da expressão de citocinas quimiotácticas pelas

células endoteliais dos vasos portais e dos sinusóides interlobulares (Coleman 2003). O infiltrado de células inflamatórias da hepatite crónica expressam numerosas citocinas, incluindo citocinas quimiotácticas dos tipos CC e CXC, e citoquinas imunomodulatórias, incluindo TNF α e várias interleucinas e interferões. As citocinas quimiotácticas recrutam células inflamatórias adicionais e induzem elevados níveis de expressão pelas células endoteliais de moléculas de adesão e receptores para ligandos de células inflamatórias (Coleman 2003; Shariff MI 2009). As citocinas imunomodulatórias estimulam tanto as células inflamatórias como os hepatócitos, para segregarem citoquinas, factores de crescimento e proteases, que estimulam a destruição e a reparação do tecido hepático. Quando as células inflamatórias entram em contacto com o parênquima lobular, os linfócitos T citotóxicos rodeiam hepatócitos individuais ou pequenos grupos de hepatócitos, muitos destes hepatócitos morrem devido à activação das vias de sinalização mediadas pelo receptor Fas ou pelo receptor TNF1 (Shariff MI 2009). Os hepatócitos resultantes da morte celular produzem um padrão patológico que é caracterizado de necrose zona 1 (periportal) (Coleman 2003; Shariff MI 2009). Os hepatócitos residuais são estimulados para proliferar pela perda de células, devido à estimulação directa pelas citoquinas e pelos factores de crescimento produzidos pelas células inflamatórias (Coleman 2003).

2.1.2.2. Cirrose hepática

A cirrose hepática é definida como o desenvolvimento histológico de nódulos regenerativos cercados por bandas fibrosas, em resposta à lesão hepática crónica. As complicações da cirrose incluem HCC e hipertensão portal (Coleman 2003; Shariff MI 2009). A maioria dos doentes com HCC tem subjacente a cirrose. Apesar do risco de HCC ser maior com cirrose, independentemente da etiologia, determinados factores transportam um maior risco que outros.

A cirrose é uma forma difusa de fibrose hepática resultante de uma hepatite prolongada e de uma extensa necrose (Roberts and Gores 2005). No fígado cirrótico, a arquitectura de um fígado normal é destruída por septos espessos de fibrose que englobam nódulos regenerativos de hepatócitos (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Deste modo, o parênquima de um fígado normal é dissecado e subdividido em agregados de nódulos, que variam de tamanho, e em que cada um é segregado por septos de tecido conjuntivo (Coleman 2003; Kojiro and Roskams 2005). Várias características gerais patológicas caracterizam a cirrose: o parênquima hepático é separado em agregados de nódulos de hepatócitos regenerativos que variam no tamanho; todo o fígado é afectado e a estrutura normal do parênquima é destruída por septos de tecido conjuntivo; e a vasculatura hepática é consumida pelos septos de tecido conjuntivo

(Coleman 2003). Existem dois tipos morfológicos de cirrose conhecidos, cirrose micronodular e cirrose macronodular. Na cirrose micronodular, os nódulos de hepatócitos nodulares raramente possuem maiores dimensões que uma unidade lobular normal de parênquima, e estão separados septo fino de tecido conjuntivo (Coleman 2003). No entanto, os nódulos não contêm tractos portais ou veias centrais. A cirrose macronodular é caracterizada pela presença de nódulos irregulares de grandes dimensões que contêm tractos portais e vasos eferentes (Coleman 2003). Esta forma de cirrose pode resultar de necrose multilobular e a formação de cicatrizes a rodear uma área do parênquima maior que um lóbulo. Além disso, a cirrose micronodular pode progredir para a forma macronodular através da regeneração persistente e da expansão dos nódulos existentes (Coleman 2003). As consequências funcionais da cirrose reflectem a obstrução do fluxo normal de sangue no fígado. No fígado cirrótico, o septo de tecido conjuntivo impossibilita a passagem normal do sangue através dos sinusóides pela formação de desvios desde as tríades portais até à veia central (Coleman 2003). A função hepática diminuída observada em doentes com cirrose é o resultado directo do reencaminhamento do sangue ao longo do parênquima. Para além da diminuição da função hepática, a hipertensão portal resulta da obstrução do fluxo de sangue no fígado. As complicações da hipertensão portal incluem desde hemorragias a varizes gastroesofágicas, formação de ascites e o desenvolvimento de esplenomegalia. A cirrose é o resultado final da hepatite crónica, e a maioria dos carcinomas hepatocelulares ocorrem num cenário de cirrose (Coleman 2003).

2.1.2.3. HBV e HCV

HBV é uma das causas mais frequentes de carcinoma hepatocelular globalmente, sendo uma infecção que afecta aproximadamente cerca de 300 milhões de pessoas mundialmente (El-Serag and Rudolph 2007; Shariff MI 2009). Estudos de caso controlo demonstraram que doentes portadores de HBV possuem um risco de 5 a 15 vezes mais elevado de desenvolverem HCC quando comparado com a população em geral. A grande maioria dos doentes com cirrose hepática, entre 70% a 90%, desenvolve HBV relacionada com HCC (Shariff MI 2009). No entanto HBV é a causa mais notória de HCC na ausência de cirrose.

O aumento do risco de HCC associado à infecção por HBV aplica-se particularmente a áreas onde o HBV é endémico. Nestas áreas é vulgarmente transmitido aos filhos pela mãe (transmissão vertical) e mais de 90% das pessoas infectadas seguem o curso crónico da doença. Este padrão é diferente em áreas com taxas de incidência baixas onde o HBV é contraído por adultos pela via sexual ou parenteral (transmissão horizontal) (El-Serag and Rudolph 2007).

A infecção crónica por HCV é um dos maiores riscos para o desenvolvimento de HCC. Os marcadores da infecção por HCV são encontrados numa variável proporção de doentes com HCC (El-Serag and Rudolph 2007).

2.1.2.4. Consumo de álcool e tabaco

Nunca foi provado o consumo de álcool ser directamente mutagénico em hepatócitos. O risco de desenvolvimento surge através da cirrose provocada pelo excesso de álcool, que, em comum com qualquer causa de doença hepática, acarreta um maior risco para o desenvolvimento de qualquer doença tumoral do fígado (Coleman 2003; El-Serag and Rudolph 2007). A abstinência não parece afectar o risco de HCC, uma vez a cirrose já está instalada. Todavia, o álcool tem sido demonstrado a actuar sinergeticamente com outros factores de risco, aumentando linearmente o risco de HCC em outras etiologias da doença hepática, como por exemplo em indivíduos com hepatite viral (El-Serag and Rudolph 2007).

2.1.2.5. Aflotoxina

A aflatoxina é uma micotoxina produzida por um fungo da espécie *Aspergillus* spp. Estes fungos são ubíquos por natureza e contaminam uma grande variedade de alimentos em regiões tropicais e subtropicais (Coleman 2003). Estudos epidemiológicos mostram uma forte correlação entre a ingestão de AFB1 e a incidência de HCC (Coleman 2003; El-Serag and Rudolph 2007). No entanto, tem sido observado que em áreas de elevada incidência de HCC e de elevada ingestão de AFB1, também correspondem a áreas onde o HBV é endémico (Shariff MI 2009). É provável que HBV e AFB1 interactuem sinergeticamente, aumentando o risco de desenvolvimento de HCC (El-Serag and Rudolph 2007).

A nível molecular, após ingerido, AFB1 é metabolizado a AFB1-exo-8, 9-epóxido, que por sua vez pode ligar-se ao DNA podendo causar hepatocarcinogénese, a partir da inactivação característica por mutação da terceira base do códon 249 do gene supressor tumoral p53, encontrado em 30-60% da população de tumores HCC em áreas AF endémicas (Coleman 2003).

2.1.2.6. Drogas hepatotóxicas e químicos

Diversos produtos químicos, misturas químicas complexas, processos industriais ou alguns agentes terapêuticos têm estado associados ao desenvolvimento de HCC em

populações humanas expostas (Coleman 2003; El-Serag and Rudolph 2007). Estes incluem a exposição terapêutica ao composto radioactivo dióxido de tório (Toratrast) para a imagiologia radiológica dos vasos sanguíneos, e a exposição a elevados níveis de determinados químicos industriais, tal como o cloreto de vinilo (Coleman 2003; El-Serag and Rudolph 2007). Além disso, ocupações específicas estão associadas a um risco ligeiramente elevado de carcinoma hepatocelular, por exemplo agricultores expostos a pesticidas. A exposição farmacológica a esteróides anabolizantes e a estrogénios pode levar ao desenvolvimento de cancro do fígado (Coleman 2003; Shariff MI 2009). Outros agentes encontram-se ocasionalmente associados ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em humanos, incluindo a ingestão de compostos de arsénico inorgânico (Coleman 2003; El-Serag and Rudolph 2007).

2.1.2.7. Doenças genéticas hepáticas

Várias doenças genéticas que podem resultar em patologia hepática, podem aumentar o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Estas condições genéticas incluem a hemocromatose, a tirosinemia hereditária, doenças de armazenamento de glicogénio, doença de Wilson, a deficiência de α -1 antitripsina e entre outros (El-Serag and Rudolph 2007). A maioria destas doenças hepáticas hereditárias está relacionada com erros inatos do metabolismo que resultam na acumulação de produtos metabólicos nos hepatócitos (El-Serag and Rudolph 2007). Lesões hepáticas resultam na acumulação anormal de produtos metabólicos, levam à hepatite crónica e cirrose (El-Serag and Rudolph 2007).

2.2. Terapêutica

Considerando que alguns anos atrás, o diagnóstico do HCC era quase sempre estabelecido em fases mais avançadas desta doença e as opções disponíveis não possuem aplicabilidade ou eficácia, a situação actual é muito diferente. À medida que os doentes são diagnosticados antes da descompensação hepática e do aparecimento de sintomas relacionados com o cancro, é possível parar ou até curar o HCC.

Nos primeiros estádios da doença, quando a cura é possível, as opções de tratamento inclui a resecção cirúrgica, transplante e a ablação percutânea. A quimioembolização transarterial é a única terapia não curativa que tem sido mostrado a aumentar a sobrevivência dos doentes, enquanto a embolização arterial sem quimioterapia ou radiação interna possui alguma actividade anti-tumoral, mas não aumenta a sobrevivência (Bruix, Hessheimer et al. 2006). A quimioterapia sistémica com diferentes agentes é marginalmente eficazes contra o HCC, mas é extremamente tóxica e não está associado com o aumento da sobrevivência. Agentes como o

tamoxifen, antiandrogénios e octreotido são completamente ineficazes (Avila, Berasain et al. 2006; Bruix, Hessheimer et al. 2006).

2.2.1. Recessão cirúrgica

Durante anos a recessão cirúrgica tem sido considerada como a única opção curativa potencial, mas actualmente compete com o transplante e ablação percutânea. A recessão é normalmente indicada a doentes com HCC solitário e com função hepática preservada (Bruix, Sherman et al. 2001; Bruix, Hessheimer et al. 2006). A restante reserva hepática deve ser suficiente para auxiliar uma função hepática adequada. Evidentemente que não representa dificuldade em alguns doentes em quem o HCC surge no fígado normal. A quimioembolização pré-operativa e a quimioterapia não têm eficácia. Resultados promissores foram relatados por imunoterapia e radioterapia selectiva, que, idealmente pode actuar locais do tumor disseminados desconhecidos (Bruix, Hessheimer et al. 2006; Shariff MI 2009). Similarmente, a administração retinóide e a terapia por interferão, também já foram sugeridos por serem activos na prevenção de HCC metacrónico (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Como o transplante hepático oferece um menor risco de recorrência e a mesma possibilidade de sobrevivência, foi recentemente proposto que pacientes que possuem um elevado risco de recorrência do tumor, deveria ser-lhes oferecida a possibilidade de transplante, mesmo na ausência de recorrência (Bruix, Hessheimer et al. 2006). A recorrência nestes casos é muitas vezes multifocal e o transplante de resgate não é fiável (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Pelo contrário, nos doentes que apresentam um baixo risco, poderiam evitar esta opção mais invasiva, e serem cuidadosamente avaliados para o desenvolvimento de HCC metacrónico (Bruix, Hessheimer et al. 2006).

2.2.2. Transplante hepático

Enquanto a recessão deve ser só restrita aos doentes com função hepática preservada, o transplante hepático é a opção de tratamento mais adequada para doentes com danos na função hepática (Bruix, Hessheimer et al. 2006). A quimioembolização reduz a carga tumoral e atrasa a sua progressão, mas não pode ser aplicado todos os doentes (Bruix, Hessheimer et al. 2006). A ablação de pequenos tumores por injeção percutânea de etanol ou radiofrequência é mais rentável, apesar de ter o risco de disseminação do tumor, em particular se o tumor for insuficientemente diferenciado ou localizar-se na periferia do fígado (Bruix, Hessheimer et al. 2006).

2.2.3. Ablação percutânea

A ablação percutânea é a última opção que pode fornecer uma completa eliminação do tumor se possuir uma dimensão reduzida. A taxa de recorrência após uma ablação com sucesso é a mesma após a recessão, e a sobrevivência também pode ser muito mais elevada (Bruix, Hessheimer et al. 2006). No entanto, a similaridade na eficácia pode ser restrita somente a tumores solitários de aproximadamente 2 cm de tamanho. Em tumores de maiores dimensões, o risco da ablação ser incompleta, por qualquer técnica de ablação disponível, sugere que a recessão é mais viável (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Em tumores de pequenas dimensões, a recessão também pode informar sobre o risco de recorrência. Portanto, prefere-se a recessão à ablação como tratamento para o HCC. A ablação foi proposta para ser eficaz em doentes com HCC isolado, com nódulo de aproximadamente 5 cm ou até três nódulos de aproximadamente 3 cm. Todavia, os melhores resultados foram obtidos em tumores solitários de aproximadamente 2 cm (Bruix, Hessheimer et al. 2006).

A injeção percutânea de etanol tem sido a técnica de ablação mais utilizada durante anos. Cerca de 95% de etanol absoluto é injectado dentro e em redor do tumor, de modo a induzir a desnaturação proteica e a trombose de pequenos vasos sanguíneos (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Esta técnica não é dispendiosa, e são raras as complicações. As principais desvantagens da injeção percutânea de etanol são que requer vários dias de injeções repetidas, cerca de quatro sessões, para atingir a necrose completa, e o seu sucesso em tumores menores que 3 cm é raro (Bruix, Hessheimer et al. 2006).

A ablação por radiofrequência pode contornar a maior parte destes problemas. Esta técnica utiliza uma corrente eléctrica alternada, fornecida através de eléctrodos, para aquecer e destruir células tumorais (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Em tumores com cerca de 2 cm é tão eficaz como a injeção percutânea de etanol e requer menos sessões; em tumores maiores que 2 cm é mais eficaz que a técnica de ablação anterior (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Todavia, a ablação por radiofrequência está associada a muitos efeitos adversos, tais como a efusão pleural e hemoperitoneu (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Esta técnica está contra-indicada a tumores que se encontram muito pouco diferenciados e a tumores que se encontram adjacentes ao tracto gastrointestinal, aos ductos biliares e aos vasos sanguíneos de maior calibre.

2.2.4. Quimioembolização transarterial/ embolização arterial transcateter

O HCC inicial costuma ser vascularizado pela veia porta hepática; à medida que o tumor se expande, o fornecimento de sangue torna-se progressivamente arterial. Este

fenómeno fornece não só a base para as características radiológicas utilizadas para o diagnóstico de HCC, mas também para a terapêutica da obstrução da artéria hepática de tumores em fases intermédias através da embolização arterial transcateter e da quimioembolização transarterial (Bruix, Hessheimer et al. 2006).

Na quimioembolização transarterial, a solução de quimioterapia, doxorubicina ou cisplatina, suspensa em lipiodol, um meio de contraste óleo que é retido selectivamente no tumor, é injectado no ramo mais pequeno da artéria hepática, que abastece directamente a lesão (Bruix, Hessheimer et al. 2006). Depois é seguido da obstrução das artérias por um agente embolizante. No caso da embolização arterial, o agente embolizante é só o agente administrada (Bruix, Hessheimer et al. 2006). A embolização transarterial transcateter e a quimioembolização estão indicadas para doentes com HCC não cirúrgico, sendo inelegíveis para a ablação percutânea, mas sem invasão vascular ou crescimento tumoral extra hepático (Bruix, Hessheimer et al. 2006). As contra-indicações incluem fluxo de sangue portal baixo, podendo levar ao enfarte hepático e doença hepática avançada. Estas duas técnicas podem provocar necrose extensiva em mais de 50% do tumor (Bruix, Hessheimer et al. 2006).

2.3. Não resposta terapêutica

O facto de o HCC ser resistente à quimioterapia convencional, e de ser raramente eficaz à radioterapia, deixa esta doença com um prognóstico relativamente pobre e a opções de tratamento muito restritas. Alterações na expressão ou na activação do p53 são frequentes em células de HCC, conferindo portanto resistência aos fármacos quimioterapêuticos (Fabregat 2009). Muitos carcinomas hepatocelulares são também insensíveis à apoptose induzida tanto pelos ligandos de receptores de morte, como o FasL ou o TRAIL, ou pelo factor de crescimento transformante β (TGF- β) (Fabregat 2009). Apesar da expressão de alguns genes proapoptóticos ser diminuída, o balanço entre a morte e a sobrevivência está desregulado devido à sobre-activação das vias anti-apoptóticas.

2.3.1. Mecanismos moleculares da hepatocarcinogénese

A hepatocarcinogénese é um processo no qual estímulos externos induzem alterações genéticas nos hepatócitos levando à proliferação celular e à produção de populações clonais. Pensa-se que a maioria dos carcinomas desenvolvem-se a partir de nódulos displásicos. A figura 2 mostra a sequência cronológica das lesões celulares que culminam no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

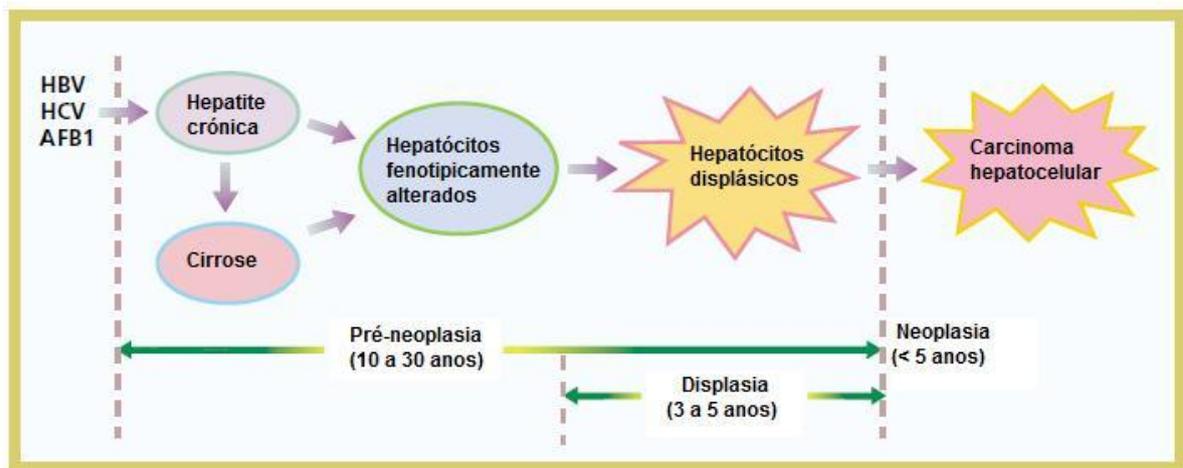


Figura 2 - Sequência cronológica das lesões celulares que culminam no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (Thorgeirsson and Grisham 2002).

Como o carcinoma hepatocelular pode ter diferentes etiologias, não foi descrita nenhuma alteração genética. A maioria dos carcinomas hepatocelulares está relacionada com infecções crónicas provocadas pelos vírus HBV ou HCV. A patogénese molecular da transformação maligna induzida pelo vírus HBV ou HCV parece ser diferente, todavia os mecanismos exactos ainda não são bem esclarecidos (Thorgeirsson and Grisham 2002). HBV é um vírus de DNA e existem pelo menos três mecanismos diferentes potenciais para a hepatocarcinogénese mediada pelo HBV. Primeiro, o DNA viral pode integrar-se no genoma do hospedeiro, induzindo instabilidade do cromossoma. Segundo, as mutações resultantes da integração do DNA viral no cromossoma, em regiões específicas, pode activar genes endógenos, por exemplo a ciclina A (Thorgeirsson and Grisham 2002; Roberts and Gores 2005). Terceiro, HBV pode modular a proliferação celular através da expressão de proteínas virais, em particular, a proteína X (HBx). Apesar desta proteína não se ligar directamente ao DNA, estudos demonstram que a proteína co-activa a transcrição de alguns genes celulares e virais importantes e coordena o balanço entre a proliferação celular e a apoptose (Roberts and Gores 2005). HBx é um transactivador que aumenta

a regulação da expressão de proto-oncogenes, como o *c-myc* e o *c-jun* e factores de transcrição como NF- κ B e AP-2 (Fabregat 2009). Os promotores dos genes associados à proliferação celular, como a IL-8, TNF, TGF- β 1 e EGFR, também podem responder à transactivação do HBx (Roberts and Gores 2005). Além da activação de factores transcripcionais e de promotores celulares no núcleo, o HBx localizado no citoplasma pode estimular várias principais vias de cinases através de factores associados ao HBx (Thorgeirsson and Grisham 2002). Esta proteína pode activar as vias JAK/STAT, Ras/Raf/MAPK, p21^{waf1}/cip1 e Wnt/ β -catenina. Além disso, esta proteína pode ligar-se ao terminal C do p53 e inactivar várias actividades dependentes do p53, incluindo a apoptose mediada pelo p53 (Roberts and Gores 2005).

A exposição alimentar à aflatoxina B, toxina fúngica encontrada em amendoins contaminados, é comum em algumas áreas onde a infecção por HBV é endémica, incluindo alguns países asiáticos e africanos (El-Serag and Rudolph 2007). A infecção simultânea com o HBV aumenta o risco de hepatocarcinogenese induzido pela aflatoxina B, interferindo com a capacidade dos hepatócitos de metabolizarem as aflatoxinas (Roberts and Gores 2005). A característica genética do HCC causado pela aflatoxina B é a mutação do gene p53 no codão 249 (Roberts and Gores 2005). Esta mutação é bastante frequente em áreas onde a exposição tanto ao HBV como à aflatoxina é prevalente, podendo sugerir um possível efeito sinérgico de ambos na indução da hepatocarcinogenese (Roberts and Gores 2005).

Ao contrário do HBV, o HCV é um vírus de RNA que não se integra no genoma do hospedeiro (Coleman 2003). Em vez disso, as proteínas virais do HCV parecem possuir um papel importante na hepatocarcinogenese. As proteínas que estão associadas à hepatocarcinogenese mediada pelo HCV são proteínas nucleares NS3 e NS5A, podem inibir a expressão pós-transcricional do p21^{waf1} (Thorgeirsson and Grisham 2002). NS4A e NS4B podem mediar a inibição da tradução, e provavelmente aumentam a degradação, de certas proteínas celulares (Thorgeirsson and Grisham 2002). A proteína do núcleo do HCV possui um papel importante na hepatocarcinogenese, através da modulação da proliferação celular, apoptose e de respostas imunológicas. A proteína do núcleo do HCV também pode promover tanto a apoptose como a proliferação celular através da sua interacção física como o p53 (Thorgeirsson and Grisham 2002).

Alterações genéticas e epigenéticas de danos repetidos e da regeneração de hepatócitos na hepatite crónica e cirrose resultantes da infecção pelo HBV ou HCV também podem contribuir para a hepatocarcinogenese, para além dos efeitos carcinogénicos de proteínas ou de oncogenes virais. De facto, a maioria dos doentes com infecção por HBV ou HCV têm hepatite crónica ou cirrose antes do desenvolvimento do HCC. Estas alterações genéticas e epigenéticas resultam na activação de mediadores positivos da proliferação celular, incluindo proto-oncogenes e as suas vias mitogénicas de sinalização, e inactivação de mediadores negativos da

proliferação celular, incluindo genes supressores tumorais (Thorgeirsson and Grisham 2002; Roberts and Gores 2005). Para além da mutação no p53, também já foram detectadas mutações em numerosos proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, tais como p73, Rb, APC, DLC-1, DLC-2, PTEN, SOCS1, GSTP1, HCCS1, Smad2/4, AXIN1, IGF-2, β -catenina, c-myc e ciclina D1 (Thorgeirsson and Grisham 2002; Coleman 2003; Fabregat 2009).

2.4. Ciclo celular

O ciclo celular compreende uma série de eventos cuidadosamente orquestrados que podem levar a célula à proliferação, senescência ou apoptose. As células progridem nas várias fases do ciclo celular a partir das interações de diferentes ciclinas com as suas respectivas subunidades CDK (Coqueret 2003). Existem várias classes ou tipos de ciclinas reconhecidas, activas em diferentes fases do ciclo celular. As ciclinas tipo D e E encontram-se associadas à transição da fase G1-S do ciclo celular (Coqueret 2003). Entre as CDK mais importantes que regulam o ciclo celular, encontram-se as CDK4 e CDK6 (que estão estruturalmente relacionadas) e a CDK2. Após o estímulo mitogénico, as células quiescentes entram no ciclo celular e as ciclinas D e E são aumentados durante a fase G1 (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). A ciclina D associa-se ao CDK4 e CDK6, enquanto a ciclina E associa-se com a CDK2. Uma vez agregadas, os complexos ciclina-CDK entram no núcleo onde serão fosforiladas pela cinase activadora da CDK (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). Estes complexos activados depois fosforilam proteínas adicionais incluindo vários membros da família retinoblastoma, como por exemplo pRB (RB1), p107 (RBL1) e p130 (RBL2) (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). A fosforilação do pRB previne sua ligação a factores de transcrição E2F, permitindo-os activar a expressão de genes que regulam a entrada para a fase S (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). Além disso, os complexos CDK-ciclina controlam a duplicação do centróssoma e transcrição do gene da histona, que por sua vez são mediadores chave da progressão do ciclo celular (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). A figura 3 mostra a progressão do ciclo celular regulada por complexos ciclina-CDK.

Os inibidores das ciclina-CDK podem modular o ciclo celular prevenindo ou limitando estas de fosforilar os seus substratos normais. Há duas classes de inibidores de CDK. As proteínas da primeira classe são inibidoras das CDK4 e CDK6 (também conhecidas por INK4). A classe de proteínas INK4 inclui as moléculas p15^{INK4B} (CDKN2D), p16^{INK4A} (CDKN2A), p18^{INK4C} (CDKN2C) e p19^{INK4D} (CDKN2D); estas ligam-se especificamente à CDK4 e CDK6 e inibem a sua associação com a ciclina D (Park 2009). As proteínas da segunda classe de inibidores são classificadas como proteínas inibidoras da cinase (KIP), e incluem p21^{CIP1/WAF1} (CDKN1A), p27^{KIP1} (CDKN1B) e p57^{KIP2} (Park 2009). As proteínas KIP são reconhecidas como inibidoras dos complexos ciclina-E-CDK e ciclina-

A-CDK, porém vários estudos demonstraram que a classe de proteínas KIP pode também interagir com as ciclinas D associadas a CDK. Quando complexadas com a sua respectiva ciclina, p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} podem bloquear a actividade de cinase da CDK (Park 2009).

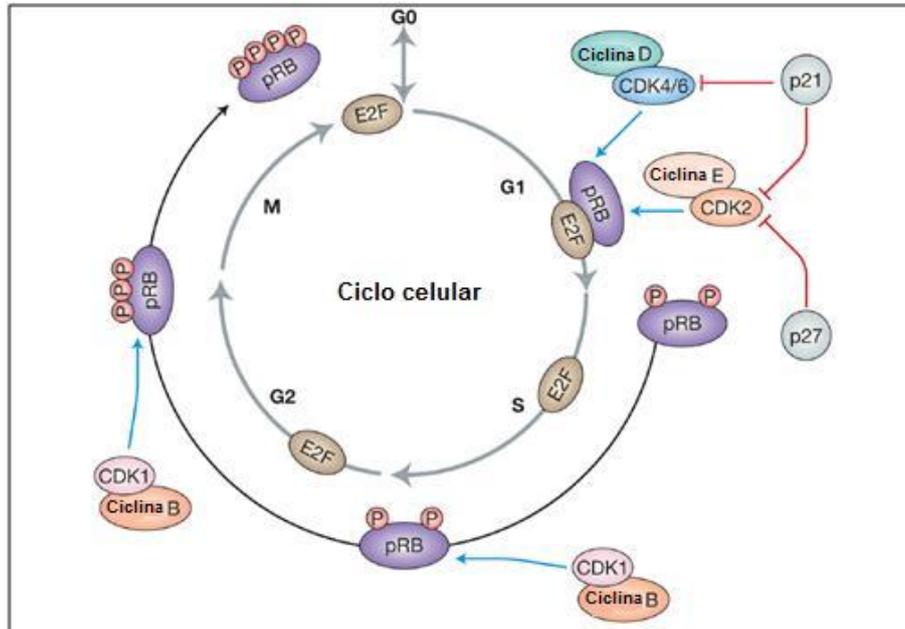


Figura 3 - A progressão do ciclo celular é regulada por complexos ciclina-CDK (Park 2009). Após a estimulação mitogénica, o a entrada da célula no ciclo celular é regulada por complexos ciclina B-CDK1 e ciclina C-CDK3. De seguida, durante a fase G1, as ciclinas D e E são aumentadas e ligam-se aos respectivos CDKs. Os complexos ciclina D-CDK4/6 e ciclina E-CDK2 fosforilam a proteína do retinoblastoma (pRb), inactivando-o e libertando o factor de transcrição E2F a partir da sua inibição. E2F activa uma variedade de genes promotores de crescimento, levando o ciclo celular para a fase S. O complexo ciclina B-CDK1 continua a inibir pRb nos pontos de controlo S/G2 e G2/M através da fosforilação de modo a completar o ciclo celular. Finalmente, após a desfosforilação do pRb, a célula sai da fase M e o pRb volta a inibir o E2F. Os inibidores dos CDK, p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, regulam o ciclo celular através da inibição da função de várias proteínas CDK indicadas.

Além disso, os complexos ciclina-CDK podem regular as moléculas WEE1 e PKMYT1, que por sua vez fosforilam resíduos específicos de treonina e de tirosina de CDK inibindo a sua actividade de cinase (Park 2009).

Os inibidores das CDK actuam como pontos de controlo vitais em várias fases do ciclo celular. Uma importante função destes pontos de controlo é de prevenir a replicação e propagação de DNA danificado em futuras células-filhas (Park 2009). Como a maioria de células cancerígenas possuem DNA danificado ou geneticamente alterado, é lógico que estas células possuem um modo de contornar estes pontos de controlo que permitem a inibição da proliferação celular.

A actividade de proliferação celular é um dos parâmetros proeminentes para a avaliação da agressividade biológica do carcinoma. No ciclo celular, o período desde o

final da fase G1 para a fase S é um dos mais importantes para a proliferação celular. As células determinam a sua proliferação quando se encontram no ponto de restrição (ponto R), no final da fase G1 (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). Quando passam para a fase S, as células já não podem parar a proliferação sozinha. A proteína mais básica neste ponto é o produto do gene do retinoblastoma (pRb) (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). O pRb na forma activa não se encontra fosforilada, e o pRb activo liga-se ao E2F, que por sua vez está relacionado com a transcrição de genes celulares essenciais à síntese de DNA, de maneira a torná-lo inactivo. Quando a pRb torna-se inactiva através da fosforilação antes de chegar ao ponto de restrição, E2F é libertada e as células podem entrar na fase S para a proliferação (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999).

Na fosforilação do pRb, duas ciclinas G1 possuem papéis importantes. Uma delas é a ciclina D1, em que o seu nível nas células aumenta da fase M para a fase G1, de modo a acelerar a última fase (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999). A ciclina D1 forma um complexo com a cinase dependente de ciclina (cdk) 4 ou cdk6 e intervém na fosforilação do pRb (Park 2009). A outra ciclina é a ciclina E, em que apenas aumenta, drasticamente, desde o final da fase G1 (após a elevação do nível da ciclina D1) até ao início da fase S. Esta ciclina liga-se à cdk2 e também fosforila o pRb. Quando a célula entra na fase S, o complexo ciclina A-cdk2 continua a função de fosforilação do pRb até ao final da fase M (Yasuhiro Ito, Hiroyuki Nagano et al. 1999).

2.4.1. Proteínas Cip/Kip como inibidores do ciclo celular

Devido a um elevado nível de homologia na sua estrutura primária, pensa-se que p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} inibem os seus alvos por mecanismos similares. Estudos baseados na estrutura destas proteínas constataram que a hélice α de uma proteína Cip/Kip inicia o primeiro contacto com a ciclina e que uma segunda hélice é inserida na fenda catalítica da subunidade CDK, bloqueando portanto o fornecimento de ATP (Coqueret 2003). Uma vasta maioria de complexos ciclina-D-CDK contém p21^{CIP1/WAF1} ou p27^{KIP1}, prevendo que as células poderão conter cdk4 não activas (Coqueret 2003). Vários estudos demonstram que esta conformação representa o estado activo do complexo de ciclina D e que baixas concentrações das proteínas Cip/Kip inibem cdk2 mas não inibem a cdk4/6 (Coqueret 2003). Outros estudos relataram que o p27^{KIP1} pode inibir a actividade cdk4, pelo menos quando estão muito expressas (Coqueret 2003).

Estes resultados levaram a um modelo no qual postula que os complexos de ciclinas D não são inibidos pelo p21^{CIP1/WAF1} ou pelo p27^{KIP1} (Coqueret 2003). Neste modelo, a proliferação celular é dependente da cdk2 livre, mas tolera complexos cdk4 ligados a proteínas Cip/Kip, titulação do p21^{CIP1/WAF1} e do p27^{KIP1} em complexos ciclina D-CDK aliviam progressivamente a ciclina E-Cdk2 da sua restrição inibitória principal,

induzindo portanto a actividade da cdk2 e a progressão do ciclo celular (Coqueret 2003). Em consonância com esta hipótese, a actividade oncogénica leva à activação da cdk2 através da captação do p27^{KIP1} para os complexos ciclina D (Coqueret 2003).

Já que a forma activada de cdk2 está localizada no núcleo, só as formas nucleares das proteínas Cip/Kip provavelmente devem ser consideradas como inibidores catalíticos de CDKs (Coqueret 2003). No entanto, o p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} também estão localizados no citoplasma e provavelmente também no DNA, onde poderão cumprir diferentes funções (Coqueret 2003). A figura 4 mostra que as proteínas cip/Kip regulam os complexos ciclina CDK no citoplasma.

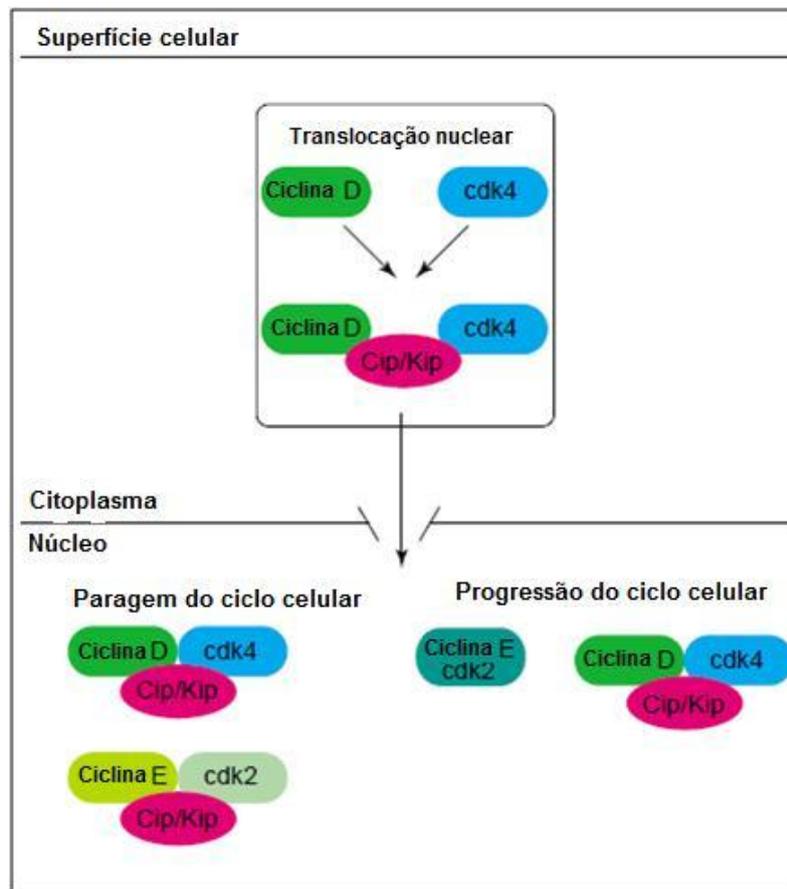


Figura 4 - Proteínas Cip/Kip regulam os complexos ciclina CDK no citoplasma (Coqueret 2003). p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} actuam como uma ponte entre a ciclina D e CDK4 para promover a sua associação. Após a sua ligação, as proteínas Cip/Kip aumentam a translocação nuclear do complexo. Uma vez no núcleo, os complexos ciclina D-CDK titulam p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} a partir da CDK2, induzindo portanto a progressão do ciclo celular. Na paragem do ciclo celular, os níveis de proteínas Cip/Kip aumentam, as ciclinas D saturam e depois ligam-se aos complexos ciclina E-CDK2 bloqueando a actividade catalítica da cinase.

2.4.2. Função e regulação do p21^{CIP1/WAF1}

O p21^{CIP1/WAF1} é conhecido por ser regulado directamente pelo supressor tumoral p53, e é considerado como uma das moléculas efectoras mais importantes do p53 (Park

2009). A proteína p53 activa directamente a expressão de p21^{CIP1/WAF1} através da ligação com o seu promotor (Park 2009). Consequentemente, em carcinomas humanos, a inactivação do p53 conduzirá também a uma diminuição dos níveis de p21^{CIP1/WAF1} (Park 2009).

Apesar da sua reconhecida associação com o p53, tornou-se claro que o p21^{CIP1/WAF1} pode ser regulado por muitas vias independentes do p53. Os níveis de p21 podem ser transcricionalmente regulados por *MYC* (Park 2009). Além disso, modificação pós-transcricional pode também afectar a função de p21^{CIP1/WAF1}. Particularmente, a fosforilação do Thr145 leva a uma localização citoplasmática do p21^{CIP1/WAF1}, que resulta na sua inactivação (Park 2009).

As proteínas E-box também podem activar p21^{CIP1/WAF1}. *BCRA1* actua como supressor tumoral através da iniciação da via de reparação de DNA, pode estimular indirectamente p21^{CIP1/WAF1}, activando p53 (Park 2009). Além disso, pode haver uma associação directa entre *BRCA1* e a expressão de p21^{CIP1/WAF1} ou de p27: *BRCA1* liga-se ao factor de transcrição *ZBRK1* através da sequência de DNA GGGXXXCAGXXXTTT, esta mesma sequência está presente no promotor de p21^{CIP1/WAF1} (Park 2009).

2.4.3. Função e regulação do p27^{KIP1}

O p27^{KIP1} é um membro da família KIP das CDKs, o qual regula negativamente a transição da fase G1-S, inibindo a actividade de cinase do complexo CDK2/ciclina A e CDK2/ ciclina E (Park 2009). Durante o ciclo celular, o nível proteico de p21 é mais elevado na fase G0/G1 e mais baixo na fase S, e é regulado principalmente através da degradação proteica via complexo proteína Skp1-Cullin-F-box, complexo ubiquitina ligase (SCF), que contém Skp2 como subunidade de reconhecimento do substrato (Park 2009). Skp2 actua como o principal limitante regulador na degradação do p27 e que a subunidade 1 da ciclina cinase (Csk1) é essencial para uma eficiente Skp2 dependente da destruição de p27 (Park 2009).

Vários factores reguladores do ciclo celular são conhecidos por influenciar o estado conformacional dos complexos que contêm p27^{KIP1} (Park 2009). Por exemplo, a ciclina D1 e CDK4 mobilizam o p27^{KIP1} dos complexos ciclina D-CDK4, enquanto o p15 e o p16 substituem o p27^{KIP1} para associarem-se com os complexos ciclina E-CDK2 (Park 2009).

A proteína p27^{KIP1} pode ser regulada por diferentes mecanismos independentes, e as células tumorais podem mudar entre diferentes modos de inactivação do p27^{KIP1}, de acordo com a progressão do tumor (Park 2009). Os níveis de mRNA de p27^{KIP1} geralmente são constantes em todo o ciclo celular, todavia, os níveis proteicos de p27^{KIP1} encontram-se sob controlo rígido, pois podem estar elevados em células que se encontram em senescência e estão reduzidos durante as fases G1 e S do ciclo

celular (Park 2009). A proteólise é considerada como um importante mecanismo para a regulação dos níveis de p27^{KIP1}, e a proteína pode ser marcada para degradação através de uma série de eventos de fosforilação (Park 2009).

Uma das vias que leva à degradação proteolítica do p27^{KIP1} é mediada através da ciclina E-CDK2 via fosforilação do Thr187 (Coqueret 2003; Park 2009). Esta fosforilação dura entre o final da fase G1 e o início da fase S o que facilita a interacção do p27^{KIP1} com o complexo SKP2 dependente da ligase E3, que, em última instância, leva à sua degradação. Um outro local de fosforilação do p27^{KIP1} é a Ser10; após o estímulo mitogénico, a fosforilação deste resíduo durante a fase G1 leva à exportação directa do núcleo do p27^{KIP1}, o que torna o p27^{KIP1} não funcional, situação similar com o p21^{CIP1/WAF1} (Coqueret 2003; Park 2009). Além disso, a fosforilação do p27^{KIP1} na Thr157 tem sido demonstrado regular a sua localização no citoplasma. SRC fosforila p27^{KIP1} na Tyr74 e Tyr88, resultando em menos p27^{KIP1} nuclear devido a uma acumulação de p27^{KIP1} citoplasmático (Coqueret 2003; Park 2009).

A inactivação do p21^{CIP1/WAF1} e do p27^{KIP1} pode também ocorrer através da ligação e subsequente captação pela ciclina D-CDK4/6 (Park 2009). É de salientar que a ausência da localização nuclear do p21^{CIP1/WAF1} ou do p27^{KIP1} pode não ser equivalente à perda de proteína. Além disso, o p27^{KIP1} pode também associar-se com Rho (ARHGAP1), afectando a migração celular independentemente da sua habilidade para ligar-se a complexos ciclina-CDK (Park 2009).

2.4.4. p27^{KIP1} como factor de prognóstico de HCC

p27^{KIP1} é amplamente considerado como um indicador de prognóstico adverso em vários tipos de cancros, visto que uma expressão diminuída ou ausente do p27^{KIP1} é observada frequentemente no núcleo celular em muitos tipos de cancro com prognóstico pobre (Matsuda 2008). No carcinoma hepatocelular, uma expressão diminuída de p27^{KIP1} encontra-se intimamente associado à invasividade tumoral, podendo actuar como indicador independente da recorrência de HCC entre vários tipos de reguladores do G1-S do ciclo celular (por exemplo pRb, p21, p16, p53, ciclina D1 e ciclina E) (Matsuda 2008). Uma elevada expressão do p27^{KIP1} é um parâmetro independente de prognóstico favorável (Matsuda 2008). As taxas de sobrevivência a este carcinoma costumam ser observadas em indivíduos cujos tumores possuem elevada expressão de p27^{KIP1} (Matsuda 2008).

3. Cancro da mama

O termo “cancro da mama” refere-se a um tumor maligno que se desenvolve em células do tecido mamário. Normalmente, o cancro da mama desenvolve-se a partir de células das glândulas mamárias ou dos ductos mamários. É menos comum o cancro desenvolver-se a partir dos tecidos do estroma, que incluem tecidos adiposos e conjuntivos fibrosos. Ao longo do tempo as células cancerígenas podem invadir o tecido mamário saudável adjacente e atingir os nódulos linfáticos presentes nas axilas. Se estas células atingirem os nódulos linfáticos, estas podem alcançar outras partes do corpo (metástases).

O cancro da mama é sempre causado por uma anormalidade genética. No entanto, só 5-10% são devido a uma normalidade herdada geneticamente. Aproximadamente 90% dos casos de cancro da mama são devido a anormalidades genéticas que podem ser resultado do processo de envelhecimento.

3.1. Factores de risco

3.1.1. Peso:

O excesso de peso está associado a um aumento do risco de cancro da mama, especialmente em mulheres após a menopausa. O tecido adiposo é a maior fonte de estrogénios após a menopausa, quando os ovários param de produzir esta hormona. Ter mais tecido adiposo significa níveis de estrogénios elevados, que por sua vez aumentam o risco de cancro da mama.

3.1.2. Dieta:

A dieta é um factor de risco para variados tipos de cancro, incluindo o cancro da mama. Alguns estudos revelam que a ingestão de uma elevada quantidade de colesterol e de outras gorduras são factores de risco para o cancro.

3.1.3. Consumo de álcool e de tabaco

Estudos demonstram que o risco de cancro da mama aumenta com a quantidade de álcool ingerido. O álcool pode limitar a capacidade do fígado controlar os níveis de estrogénios no sangue, por conseguinte pode aumentar o risco. O tabaco está associado a um pequeno aumento do risco de cancro da mama.

3.1.4. Exposição ao estrogénio

Como a hormona feminina estrogénio estimula o crescimento das células mamárias, a exposição ao estrogénio durante longos períodos de tempo, sem intervalos, pode aumentar o risco de cancro da mama.

3.1.5. Uso de contraceptivos orais

A utilização de contraceptivos orais pode aumentar o risco de cancro da mama, mas só durante períodos limitados de tempo. Mulheres que tenham interrompido a utilização de contraceptivos orais há mais de 10 anos, não terão um aumento de risco de cancro da mama.

4. Fitoterapia

Historicamente, as plantas têm fornecido um manancial de novos compostos para fármacos e têm sido uma alternativa no tratamento de várias doenças. A elevada variedade de metabolitos secundários das plantas têm diversas fontes de importantes compostos farmacêuticos. Inicialmente, os produtos naturais eram utilizados na forma inalterada, como concentrados de extractos vegetais. Tornou-se uma questão complexa quando eram utilizados produtos com concentrados de extractos de plantas, uma vez que a sua actividade não era devido só a um único composto, mas sim devido a uma mistura de vários compostos. Alguns compostos podem aumentar ou diminuir a actividade terapêutica ou a toxicidade dos fármacos. Esta acção combinada de numerosos compostos activos é devido a vários tipos de interacções entre o extracto e o fármaco.

Os metabolitos secundários das plantas possuem um papel importante na sobrevivência da planta, uma vez que intervêm nos mecanismos de defesa da planta de modo a assegurar uma protecção contra microorganismos. Tem havido um aumento da utilização de fitoquímicos para substituir os fármacos já existentes.

Um grande número de fitoquímicos tem sido identificado por possuírem efeitos antitumorais em vários sistemas experimentais. Estes oferecem a oportunidade de afectarem vários alvos ou porções das vias de sinalização que modulam a expressão genética, a progressão do ciclo celular, a proliferação, mortalidade celular, metabolismo e apoptose (Hemalswarya and Doble 2006).

Uma dieta variada de fitoquímicos tem sido sugerida para bloquear a iniciação do cancro ou para supressar o seu desenvolvimento. Estes agentes utilizam os seus

efeitos pela interacção com numerosas proteínas celulares que, por sua vez, afectam múltiplos passos nas vias que vão dar origem à tumorigenese. Muitas destas alterações envolvem redes de quinases, como a fosfatidilinositol 3-cinase (PI-3K), e a proteína cinase, que mantém a homeostase nas células. Estas vias de cinase convergem para activar os factores de transcrição a jusante, como por exemplo o factor nuclear- κ B (NF- κ B) e a proteína activadora 1. De facto, a curcumina (extracto de açafrão), genisteína (soja), galato de (-)-epigallocatequina (EGCG) (chá verde), entre outros fenóis provenientes de plantas poderão ter efeitos anti-tumorigénicos, através da inibição de vários mecanismos (Garg, Buchholz et al. 2005). Além disso, os polifenóis provenientes destes extractos poderão aumentar os efeitos tumorocidas da quimioterapia e radioterapia, protegem as células normais de possíveis danos devido à terapia e aumentam a biodisponibilidade dos agentes quimioterapêuticos (Garg, Buchholz et al. 2005). A figura 5 mostra moléculas celulares implicadas na resistência à quimioterapia e radioterapia.

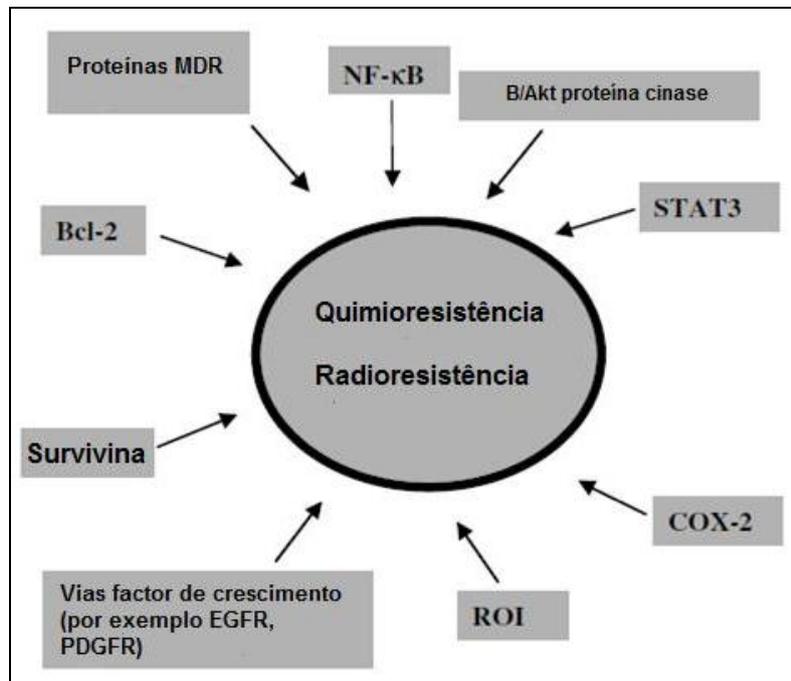


Figura 5 - Moléculas celulares implicadas na resistência à quimioterapia e radioterapia. PDGFR, receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas (Garg, Buchholz et al. 2005).

4.1. Vias múltiplas de sinalização conduzem à resistência à quimioterapia e radioterapia

4.1.1. Expressão de intermediários reactivos de oxigénio

Indutores potentes das vias pró-apoptóticas, como os membros da superfamília factor de necrose tumoral (TNF), contribuem tanto para a resposta do tumor à morte celular aos tratamentos contra o cancro como para o desenvolvimento de resistência a estes tratamentos. Estes efeitos são mediados através da produção de ROI, intermediários reactivos de oxigénio, que são também conhecidos por espécies reactivas de oxigénio, ROS. Por exemplo, TNF altera a permeabilidade da membrana mitocondrial, conduzindo à libertação do citocromo c e à subsequente activação da caspase, que, por sua vez, conduz à apoptose (Garg, Buchholz et al. 2005). Além disso, o factor associado à sinalização de TNF está directamente ligado ao mecanismo de transporte de electrões na mitocôndria e à subsequente produção de ROS (Garg, Buchholz et al. 2005). Através da activação de NF- κ B, ROS é um mediador da sinalização anti-apoptótica. Portanto, as espécies reactivas de oxigénio, ROS, são mediadoras tanto da sinalização anti-apoptótica como da pró-apoptótica. A quimioterapia e a radioterapia induzem fortemente a sinalização de TNF, e ao fazê-lo utilizam a produção de ROS para induzir tanto a apoptose como a resistência. Os polifenóis de origem vegetal podem também utilizar ROS na sinalização (Garg, Buchholz et al. 2005).

4.1.2. A activação de NF- κ B

A expressão do factor de transcrição NF- κ B está envolvida no largo espectro de respostas celulares, incluindo o controlo do ciclo celular, apoptose e stress. Entre as várias doenças ligadas à activação de NF- κ B, o cancro tem tido maior foco, uma vez que o papel de NF- κ B como um regulador central da resposta inflamatória, a regulação dos genes envolvidos na sobrevivência da célula e na progressão tumoral (Garg, Buchholz et al. 2005). Além disso, a sua actividade constitutiva tem sido frequentemente elevada em vários tipos de tumores, incluindo a leucemia, linfoma, cancro da próstata, cancro da mama, cancro do cólon, melanoma e entre outros. NF- κ B é activado por agentes quimioterapêuticos e pela radiação ionizante, e pode levar à resistência ao tratamento induzido nas células tumorais. A supressão do NF- κ B por diferentes métodos pode sensibilizar as células tumorais tanto à quimioterapia como à radioterapia (Garg, Buchholz et al. 2005).

4.1.3. Expressão do COX-2

COX-2, é uma enzima largamente expressa em resposta a desordens inflamatórias e ao cancro, é um mediador da produção de prostanglandinas e poderá ser um alvo na terapia anti-tumoral (Garg, Buchholz et al. 2005). A sua presença tem sido associada aos fenótipos de tumores mais agressivos e aos piores prognósticos de doentes com cancro da mama, cancro do cólon, cancro do pulmão e cancro do pâncreas. COX-2 está envolvida em múltiplos aspectos da carcinogenese, incluindo a manutenção do crescimento tumoral, rápida propagação das metástases e à resistência a várias terapias (Garg, Buchholz et al. 2005).

4.1.4. Expressão do bcl-2

Bcl-2 é um membro da família de proteínas Bcl-2 que regulam tanto a sinalização anti-apoptótica como pró-apoptótica nas células. O Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica que se encontra sobre-expressa num grande número de tumores sólidos e hematopoiéticos, e utilizam a sua influência para aumenta a sobrevivência celular, que contribui para a resistência aos tratamentos convencionais, incluindo a quimioterapia e radioterapia (Garg, Buchholz et al. 2005). Vários estudos têm demonstrado que a inibição de Bcl-2, sensibiliza as células tumorais à quimioterapia e radioterapia (Garg, Buchholz et al. 2005).

4.1.5. Expressão da survivina

A survivina é um membro da família IAP e possuem a função de inibição da via apoptótica através do bloqueio da activação da caspase 9. Vários estudos indicam que as suas propriedades indutoras de cancro e a sua sobre-expressão em vários tecidos malignos e a sua ausência na maioria dos tecidos normais (Garg, Buchholz et al. 2005). A survivina encontra-se envolvida na angiogénese e é necessária no efeito anti-apoptótico do factor de crescimento vascular endotelial. Além disso, elevados níveis de survivina têm estado associados a uma alta taxa de recorrência tumoral e à resistência elevada do tumor à quimioterapia e à radioterapia (Garg, Buchholz et al. 2005).

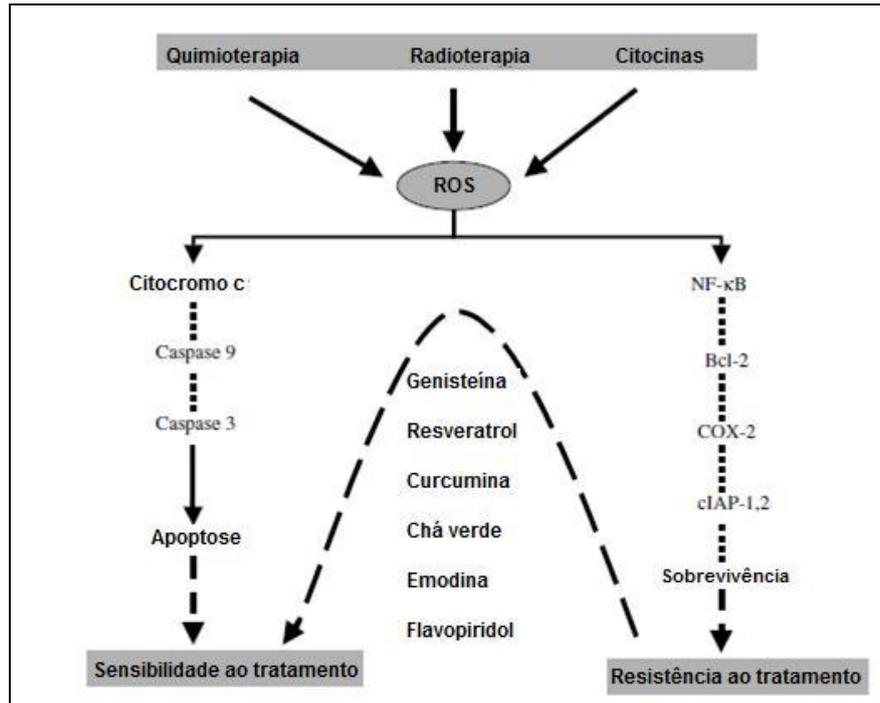


Figura 6 - A quimioterapia e a radioterapia induzem tanto sinalização pro-apoptótica, conduzindo a célula à morte e sensibilidade ao tratamento, como sinalização anti-apoptótica, conferindo à célula resistência ao tratamento. Polifenóis de origem vegetal podem auxiliar a aumentar a sensibilidade e a inibir as vias que vão conduzir à resistência (Garg, Buchholz et al. 2005).

4.2. Polifenóis de algumas plantas utilizados em fitoterapia

A genisteína é uma isoflavona derivada da soja que actua como inibidora da tirosina cinase e possui uma estrutura com uma afinidade para o receptor do estrogénio e para as vias mediadas pelo androgénio (Garg, Buchholz et al. 2005). Este composto possui uma actividade quimiopreventiva nos cancros da mama, próstata e entre outros. De facto, estudos epidemiológicos associam as baixas incidências de cancro da mama e da próstata, em populações asiáticas, a diferenças significativas na dieta, incluindo a elevada concentração de isoflavonas da soja, como a genisteína. A genisteína inibe o crescimento de células cancerígenas através da modulação dos genes relacionados com o ciclo celular e apoptose, e é um potente inibidor da angiogénese e de metástases (Garg, Buchholz et al. 2005). É de salientar que a genisteína combinada com a quimioterapia e radioterapia pode aumentar a eficácia destas terapias (Hemalswarya and Doble 2006).

O Resveratrol pode ser encontrado em várias plantas, como por exemplo amendoins, uvas e entre outras. Este composto possui propriedades anti-tumorais, possuindo a capacidade de supressar a proliferação de cancros linfóides e mieloides, mielomas

múltiplos, cancro da mama, cancro da próstata, cancro do cólon, cancro do pâncreas, melanoma, cancro dos ovários e entre outros (Hemalswarya and Doble 2006).

A curcumina é um derivado diferuloilmetano do açafrão, e possui propriedades antitumorais e pode ser um complemento na quimioterapia e na radioterapia. Este composto tem a capacidade de supressar a proliferação de uma grande variedade de células tumorais; baixa a regulação dos genes alvo do NF- κ B, como *COX-2*, *Inos*, *mmp-9* e ciclina D1; inibe a expressão de receptores do factor de crescimento, incluindo EGFR e EGFR 2 humano; e inibe várias proteínas cinases envolvidas nas vias de sinalização que conduzem à carcinogénese (Hemalswarya and Doble 2006).

O chá verde é utilizado como um agente medicinal na Ásia há mais de 4 000 anos e é derivado das folhas de *Camellia sinensis* e é um agente quimiopreventivo eficaz e um modulador da quimioterapia (Hemalswarya and Doble 2006). Várias investigações demonstraram que com o consumo de chá verde há um risco mais baixo de poder contrair vários cancros, incluindo pulmão, colorectal, pancreático e do estômago (Garg, Buchholz et al. 2005).

A silimarina pode potenciar os efeitos da quimioterapia no cancro. Em células do cancro da mama, MDR, potenciou a citotoxicidade da doxorubicina, através da inibição da actividade P-glicoproteína ATPase, que é responsável pelo efluxo celular de substâncias tóxicas (Garg, Buchholz et al. 2005). Esta observação foi consistente com estudos em que revelam que a silimarina e o resveratrol aumentam significativamente substratos proteicos resistentes ao cancro da mama em células que sobre-expressavam esta proteína (Garg, Buchholz et al. 2005). Um outro estudo revelou efeitos sinérgicos da silibilina com a cisplatina ou com a doxorubicina em células do cancro da mama e dos ovários (Garg, Buchholz et al. 2005). Do mesmo modo, a silibilina potenciou o efeito inibidor do crescimento da doxorubicina em células do cancro da próstata e estava associada com a paragem do ciclo celular (Garg, Buchholz et al. 2005).

5. *Cynara cardunculus*

A *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae), vulgarmente conhecida por cardo, é uma espécie mediterrânica que cresce normalmente em regiões áridas com temperaturas e salinidade elevadas e com períodos de seca durante o Verão. Esta planta é muito utilizada e é um dos ingredientes da dieta mediterrânica. As flores de *Cynara cardunculus* são utilizadas tradicionalmente na preparação de queijos, enquanto que as folhas são popularmente conhecidas pelo seu potencial terapêutico como diurético, colerético, antidiabético e de agente antimicrobiano. Todavia, a sua actividade antioxidante e antibacteriana bem como a sua composição fenólica têm sido muito pouco estudados (Falleh, Ksouri et al. 2008).

5.1. Ciclo de crescimento da *Cynara cardunculus*

Cynara cardunculus é uma planta que se encontra totalmente adaptada ao clima mediterrânico. As características típicas dos climas mediterrânicos são de a precipitação anual ser baixa, bem como a sua distribuição irregular e os períodos de seca no Verão, sendo esta uma das estações menos favoráveis para o crescimento da planta. A estratégia que esta espécie possui para ultrapassar os períodos menos favoráveis ao seu crescimento é de completar o seu ciclo reprodutivo até ao Verão. As partes aéreas da planta secam durante esta estação, mas as partes subterrâneas permanecem vivas da mesma forma como em outras plantas vivazes.

O primeiro ciclo de crescimento da *Cynara cardunculus* começa com a germinação da semente, normalmente no início do Outono. Primeiro emergem os dois cotilédones, e logo depois crescem várias folhas, dando gradualmente origem a uma roseta de folhas. Esta roseta normalmente desenvolve-se lentamente mas de maneira estável. A planta permanece na fase roseta durante o Inverno até ao início da Primavera. No final desta estação a planta desenvolve uma folha de escapo floral ramificada. Após a floração e fertilização, os frutos amadurecem, a biomassa aérea seca no Verão. Quando as condições climáticas tornam-se mais favoráveis as gemas perenes da parte basal da planta brotam e começa um novo ciclo de desenvolvimento. Esta sucessão de ciclos anuais de crescimento pode durar vários anos (Fernández, Curt et al. 2006).

5.2. Constituintes biologicamente activos

Os constituintes biologicamente activos da *Cynara cardunculus* L., Asteraceae são flavenóides (derivados estruturais da apigenina e da luteolina), cinarina (ácido 1,5-dicafeoilquinico), cumarinas e esteróis. Uma propriedade proeminente dos flavenóides é a sua capacidade antioxidante, que pode dar alguma protecção contra o stress oxidativo (Bezáková, Grancai et al. 2007). A elevada abundância dos compostos polifenólicos é característica da família Asteraceae, podendo estar relacionado com as condições climáticas extremas do habitat onde as espécies desta família estão inseridas (temperaturas elevadas, exposição solar elevada, salinidade e seca), levando à estimulação da biossíntese de metabolitos secundários (polifenóis) (Falleh, Ksouri et al. 2008).

A actividade antioxidante dos flavenóides e de alguns polifenóis parece ser devido à sua capacidade de remoção espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio. Os flavenóides induzem enzimas de desintoxicação, inibem a agregação de plaquetas e possuem uma actividade inibitória da oxidação do LDL. No entanto, os efeitos inibitórios destes compostos em enzimas pro-oxidantes tais como a xantina oxidase, mieloperoxidase e lipoxigenases podem contribuir adicionalmente para o potencial efeito benéfico dos flavenóides e dos polifenóis. A cinarina possui, entre outras, uma actividade hepatoprotectora, hipolipidémica, hipocolesterolémica e antimicrobiana (Bezáková, Grancai et al. 2007).

Ácidos cafeoilquínicos e glicósidos de luteolina e de apigenina, presentes na folha, foram identificados por HPLC (Pinelli et al., 2007; Valentao et al., 2002). Nas brácteas involucrais desta planta, vários compostos podem ser identificados, tais como: b-sitosterol, sitosteril-3 β -acetato, taraxasterol e taraxasteril-3 β -acetato (Grančai et al., 1992), apigenina, apigenina 7-glucosido, luteolina e luteolina 7-glucosido (Grančai et al., 1993), apigenina 7-rutinosida, luteolina e luteolina 7-rutinosida (Grančai et al., 1996), e apigenina 7-metilglucuronida (Mučaji et al., 2000), escopolina e escopoletina (Grančai, Nagy, Mučaji, Suchý, & Ubik, 1994a), cinarina (Grančai, Nagy, Suchý, & Novomeský, 1994b) e ácido clorogénico (Mučaji et al., 2000), cinasaponinas A e H, e os seus derivados metilados (Mučaji et al., 1999) e cinasaponinas B e K (Mučaji et al., 2001). Estudos anteriores revelam que a apigenina, a luteolina e os seus glicósidos são poderosos antioxidantes (Kwon, Kim, Kim, Kim, & Kim, 2002; Müller, Vasconcelos, Coelho, e Biavatti, 2005). As propriedades antioxidantes da luteolina 7-glucosido e do respectiva aglicona, luteolina, já foram observadas contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Brown e Rice-Evans, 1998) (Kukic, Popovic et al. 2008).

Apesar de todas estas propriedades biológicas e compostos biologicamente activos identificados, na realidade o papel que estes extractos podem desempenhar a nível celular e molecular têm sido muito pouco estudados. Assim, com este trabalho pretende-se investigar a actividade biológica de extractos derivados da *Cynara cardunculus* na regulação do ciclo celular em células de hepatocarcinoma humano e em células do cancro da mama. Para tal foi analisado a nível do mRNA o efeito de extractos de *Cynara cardunculus* na expressão de dois conhecidos marcadores do ciclo celular, p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}. Para a análise do ciclo celular, escolhemos o ponto de controlo G1/S, uma vez que o período desde o final da fase G1 para a fase S é um dos mais importantes para a proliferação celular. As células determinam a sua proliferação quando se encontram no ponto de restrição (ponto R), no final da fase G1. Quando passam para a fase S, as células já não podem parar a proliferação sozinha. Posteriormente, foi realizada a análise do efeito dos extractos em células de hepatocarcinoma humano e do cancro da mama, pela técnica de citometria de fluxo.

6. Problemática

Os compostos polifenólicos podem ser obtidos a partir de diferentes tecidos vegetais incluindo raízes, troncos, folhas, flores, frutos e sementes. A *Cynara cardunculus*, vulgarmente conhecida por cardo, encerra em si um manancial de compostos fitoquímicos, entre os mais abundantes os flavenóides (derivados estruturais da apigenina e da luteolina), cinarina (ácido 1,5-O-dicafeoilquinico), cumarinas e esteróis. Uma propriedade proeminente destes fitonutrientes é a sua capacidade antioxidante, que pode dar alguma protecção contra o stress oxidativo, bem como uma reconhecida actividade hepatoprotectora, hipolipidémica e hipocolesterolémica.

O carcinoma hepatocelular (HCC) trata-se de um tumor altamente maligno, com uma previsão média de vida muito reduzida, em que os tratamentos disponíveis, nomeadamente o transplante hepático, cirurgia seguida de quimioterapia, são relativamente pouco eficazes. Deste modo, a prevenção parece ainda ser o melhor tratamento disponível. É neste contexto que muitos fitoquímicos, como seja o caso da silimarina, têm já uma reconhecida função onco-protectora, devido às suas propriedades farmacológicas, desempenhando um importante papel como antioxidante celular.

Contrariamente ao que acontece com a silimarina, as propriedades biológicas e farmacológicas da *Cynara cardunculus*, bem como a sua importância em hepatocarcinomas são totalmente desconhecidas. No entanto, estudos preliminares demonstram que extractos de *Cynara cardunculus* induzem o abrandamento do crescimento celular, sugerindo um papel anti-proliferativo, no contexto de carcinomas hepáticos, de um modo semelhante ao que acontece com a silimarina.

A caracterização biológica dos extractos de *Cynara cardunculus* no carcinoma hepatocelular permitirá não só a sua valorização farmacológica, ampliando o seu espectro de actividade biológica, como também contribuir para uma melhor prevenção e tratamento deste tipo de carcinomas.

7. Finalidade

Neste trabalho pretendeu-se determinar a actividade biológica dos extractos derivados de *Cynara cardunculus*, na regulação do ciclo celular em células de hepatocarcinoma humano e em células de cancro da mama.

7.1. Objectivos gerais

- ✓ Avaliar o efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco na proliferação de células HepG2;
- ✓ Estudar o efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco da expressão de p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} em células HepG2 e MDA-MB 231;
- ✓ Efeito do extracto FCF na análise do ciclo celular de HepG2 e de MDA-MB 231, por citometria de fluxo.

7.2. Objectivos específicos

- ✓ Conhecer
 - As condições de manutenção de culturas de células animais.
 - As condições de manutenção e de crescimento de células tumorais HepG2 e MDA-MB 231;
 - A epidemiologia e factores de risco do carcinoma hepatocelular;
 - A terapêutica do carcinoma hepatocelular e do carcinoma mamário;
 - Os métodos e as técnicas utilizadas em biologia molecular para a determinação da expressão genética de inibidores do ciclo celular;
 - O procedimento experimental para a concretização dos objectivos propostos;
 - Cuidados de segurança a ter no laboratório.
- ✓ Compreender
 - A relevância e potencial da técnica de citometria de fluxo;
 - Os mecanismos moleculares de hepatocarcinogenese;
 - Vias múltiplas de sinalização conduzem à resistência à quimioterapia e radioterapia;
 - A regulação do ciclo celular e as diferentes fases;

- A função e regulação dos inibidores do ciclo celular p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}.
- Actividade biológica *Cynara cardunculus* e os princípios biologicamente activos;

✓ Comparar

- O efeito de diferentes concentrações de extractos da *Cynara cardunculus* nas células HepG2 e MDA-MB 231;
- A concentração em fenóis e flavenóides em diferentes extractos de *Cynara cardunculus*;
- Os efeitos das diferentes concentrações de extractos de *Cynara cardunculus* na proliferação celular das células HepG2;
- Os resultados obtidos com trabalhos de autores de grande importância nesta área de investigação científica;

✓ Avaliar

- O efeito dos extractos de *Cynara cardunculus* na proliferação das células HepG2;
- A aplicabilidade dos marcadores do ciclo celular seleccionados para o estudo dos efeitos dos extractos no ciclo celular das células HepG2 e MDA-MB 231;
- As potencialidades da técnica de citometria de fluxo na determinação da distribuição das fases do ciclo celular de células HepG2 e MDA-MB 231;

✓ Aplicar:

- Os conhecimentos adquiridos sobre a regulação do ciclo celular, dos inibidores e das técnicas disponíveis para a avaliação da expressão genética de p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} e da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, no estabelecimento de protocolos adequados, para que os objectivos gerais deste trabalho sejam cumpridos com a maior eficácia;
- Correctamente os métodos moleculares necessários na realização dos trabalhos laboratoriais, de modo a minimizar os erros;
- A experiência de trabalho laboratorial adquirida em estudos de investigação futuros, com vista ao aperfeiçoamento da reprodutibilidade dos métodos e das técnicas utilizadas.

II – Materiais e métodos

1. Materiais

1.1. Linha celular e cultura:

As culturas de células HepG2 humanas (ATCC) em monocamadas foram mantidas numa atmosfera húmida a 37°C e a 5% CO₂, no meio de cultura Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, SIGMA) com 10% de soro fetal bovino e com 1% de antibiótico (Penstrep). O meio de cultura foi mudado de dois em dois dias, sendo a monocamada de células lavada com uma solução de PBS a 1%. As células MDA-MB 231 (ATCC) em monocamadas foram mantidas numa atmosfera húmida a 37°C e a 5% CO₂, no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA) com 10% de soro fetal bovino e com 1% de antibiótico (Penstrep). Quando as culturas de células ficavam confluentes procedia-se à sua subcultura, de modo a prevenir a morte celular. Para se proceder à subcultura, as células foram ressuspensas em tripsina a 1% durante 2 minutos. Seguidamente coloca-se o meio de cultura de modo a neutralizar a acção da tripsina. As células eram recolhidas para um tubo de recolha e depois procedia-se à centrifugação, contagem e posterior cultura em frascos. Após a contagem foi transferido um determinado número de células para um novo frasco contendo meio de cultura pré-aquecido, a 37°C.

2. Métodos

2.1. Determinação do valor de IC₅₀ para o extracto de FCF na proliferação celular de células HepG2

Para a determinação do valor de IC₅₀, as células HepG2 foram incubadas com diferentes concentrações em peso seco, 50-500µg/mL, de extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco durante 48h a 37°C, 5% CO₂, em placas de 12 poços. Posteriormente, procedeu-se à tripsinização e recolha das células. Foi realizada a contagem das células com o auxílio da câmara de contagem de Neubauer com a adição do corante de *tripan blue*. Depois determinou-se a viabilidade celular. Ver anexo III.

2.2. Extração do RNA

As células HepG2 foram incubadas com o extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco, concentrações em peso seco de 100µg/mL e de 200µg/mL, e com o extracto de caule de cardo cultivado fresco, com a concentração de 200µg/mL, durante 48h a 37%, 5% CO₂, em frascos T25. Após as 48h procedeu-se à tripsinização e recolha das células. A extracção de RNA das *pellets* obtidas foi realizada com o kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Procedeu-se à ruptura das células com o tampão RTL e foram homogeneizadas. O etanol a 70% foi adicionado ao lisado celular, criando condições que promoviam a ligação selectiva do RNA à membrana *RNeasy*. A amostra é depois transferida para a coluna *RNeasy Mini Spin*. O RNA total liga-se à membrana e os contaminantes foram removidos, e este RNA foi eluído com água sem RNase. Após a lavagem, os passos de eluição são realizados por centrifugação numa microcentrifuga. Por fim, realizou-se a análise da integridade do RNA por electroforese em gel de agarose e quantificação do RNA de cada amostra. O protocolo mais detalhado encontra-se no Anexo I.

2.3. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA utilizou-se o kit *iScript™ cDNA Synthesis* (BIORAD). Os reagentes do kit são descongelados no gelo. Enquanto se preparou a mistura reaccional, descongelou-se e conservou-se o RNA no gelo, de modo a minimizar o risco de degradação. Misturaram-se os reagentes em gelo e adicionou-se o volume de amostra de RNA necessário de modo a que a massa fosse igual a 1µg. Os reagentes do kit eram *iScript Reaction Mix*, que contém oligo-dt, *primers* e dNTP's; *iScript Reverse Transcriptase*; *nuclease-free water* e a amostra de RNA. Seguidamente, foi feita a incubação da mistura no termociclador (5 minutos a 25°C; 30 minutos a 42°C; 5 minutos a 85°C e ∞ a 4°C, sendo este último opcional). No final as amostras de cDNA foram guardadas a -20°C. O protocolo mais detalhado encontra-se no Anexo I.

2.4. Amplificação do cDNA por PCR com os primers específicos para os marcadores p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}

Para a análise da expressão dos marcadores p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} pela técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados primers específicos foram '5-TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA-3' e 5'-CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA-3' para o p21^{CIP1/WAF1} e 5-CCGGTGGACCACGAAGAGT-3' e 5'-GCTCGCCTCTCCATGTCTC-3' para o p27^{KIP1}. Resumidamente, as reacções foram realizadas num volume de reacção de 25µL contendo água destilada, *buffer Dream Taq* (Fermentas) a 10%, cloreto de magnésio 1,5 µM, dNTP's 200 µM, os *primers forward* e *reverse* 0,6 µM e Taq polimerase (Bioron). No termociclador (Biorad) foram aplicadas as seguintes condições: um passo inicial

activador durante 4 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos incluindo o passo de desnaturação durante 30 segundos a 95°C, o passo de annealing a 55°C para o p21^{CIP1/WAF1} e a 57°C para o p27^{KIP1}, durante 1 minuto, e a obtenção dos produtos de PCR a 72°C, durante 1 minuto e 30 segundos e, por fim a reparação das sequências nucleotídicas durante 10 minutos a 72°C.

2.5. Citometria de fluxo

O ciclo celular foi analisado pela coloração do DNA por iodeto de propídeo e adquirido num citómetro de fluxo FACS Scan (BD Biosciences), equipado com laser de argón de 15 mW, 488 nm, refrigerado a ar, com expansor prismático e lentes esféricas, criando um feixe elíptico de 22x66 µm. As medições são realizadas numa câmara rectangular de quartzo de 430 x 180 µm, com fluxo de aproximadamente 100 a 200 células por segundo. As dispersões de luz frontal e lateral são detectadas com fotodiode (lateral e frontal), com valores obtidos na escala logaritmica. Os sinais luminosos são captados por filtros de 600/650 para o iodeto de propídeo. O citómetro é acoplado a um computador que realiza a aquisição dos parâmetros e armazenamento de dados no disco rígido.

As células HepG2 foram incubadas com o extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco, concentrações em peso seco de 100µg/mL e de 150µg/mL, durante 48h a 37%, 5% CO₂, em frascos T25. As células MDA-MB-231 foram incubadas com o extracto de folha de cardo cultivado fresco, com as concentrações em compostos fenólicos de 0,5µg/mL, 0,74µg/mL e de 1µg/mL, durante 48h a 37%, 5% CO₂, em frascos T25. Após o período este de incubação realizou-se a tripsinização e recolha das células para a contagem. Posteriormente, foram feitas as pellets em eppendorfs, o número de células rondavam 1x10⁶ células/mL. Posteriormente, procedeu-se à lavagem com PBS a 1% gelado, esta lavagem foi repetida duas vezes, e à fixação com etanol a 70%. No dia da leitura no citómetro de fluxo, era adicionado à *pellet* o tampão citrato, iodeto de propídeo (Invitrogen), triton X-100 e RNase A (Fermentas). As medições foram efectuadas no canal de fluorescência FL3 e no nível de detecção E-1. O número de eventos/segundo totais registados foram de 25000. Os protocolos mais detalhados encontram-se no Anexo I.

III - Resultados e Discussão

1. Caracterização dos compostos fenólicos presentes em vários órgãos da *Cynara cardunculus*

Foi realizado um estudo prévio de caracterização dos compostos fenólicos e flavenóides presentes na espécie *Cynara cardunculus*.

A figura 7 mostra a concentração em peso seco de fenóis e de flavenóides presentes em cada órgão desta planta.

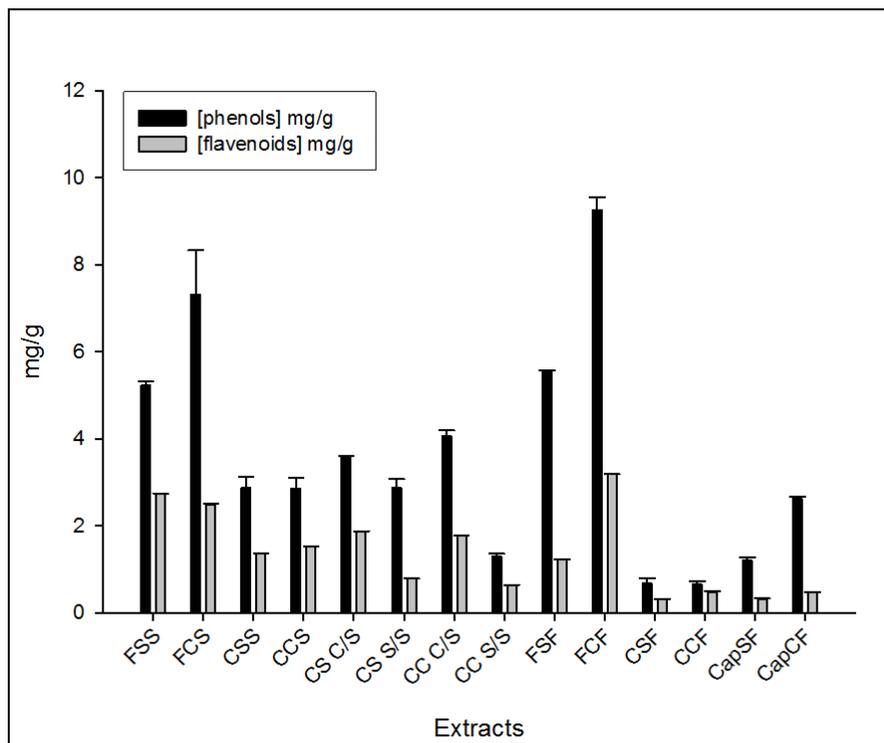


Figura 7 - Concentração total, em peso seco, de fenóis e de flavanóis presentes em vários órgãos de *Cynara cardunculus*. FSS – folha de cardo selvagem seco; FCS – folha cultivada seca; CSS – caule selvagem seco; CCS – caule cultivado seco; CS C/S – capítulo selvagem com semente; CS S/S – capítulo selvagem sem semente; CC C/S – capítulo cultivado com semente; CC S/S – capítulo cultivado sem semente; FSF – folha selvagem fresca; FCF – folha cultivada fresca; CSF – caule selvagem fresco; CCF – caule cultivado fresco; CapSF – capítulo selvagem fresco; CapCF – capítulo cultivado fresco. (Velez, Z. submitted to Molecular Nutrition and Food Research).

De acordo com a figura 7, pode-se observar que o extracto de folha de cardo cultivado fresco possui uma concentração maior de fenóis e de flavenóides, enquanto o extracto de cardo cultivado fresco (CCF) possui a concentração mais baixa de fenóis e de flavanóis. Os extractos de folha de cardo selvagem seco (FSS), de folha de cardo cultivado selvagem e o de folha de cardo selvagem fresco (FSF) possuíam uma elevada concentração em fenóis e flavenóides, quando comparado com os extractos provenientes do caule. Os extractos do capítulo selvagem fresco (CapSF) e de capítulo

cultivado fresco (CapCF) possuem a concentração de flavanóis mais baixa, quando comparado com os restantes extractos analisados. Portanto, o extracto de folha cultivada fresca foi escolhido para este trabalho, uma vez que é detentora da maior concentração de fenóis e de flavenóides totais.

Após esta análise aos extractos, surgiu a necessidade de realizar um estudo preliminar sobre o efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco (FCF) nas células de HepG2. Portanto, estas células foram incubadas com diferentes concentrações deste extracto, 50 a 500 $\mu\text{g/ml}$ deste extracto, durante 48 horas. Após este período de incubação foi realizada uma contagem das células vivas e mortas, com o auxílio da câmara de Neubauer e do corante *trypan blue*, de modo a determinar a viabilidade celular. A figura 8 mostra o efeito das diferentes concentrações, 50 a 500 $\mu\text{g/ml}$, de extracto de folha de cardo cultivado fresco (FCF), na proliferação das células HepG2.

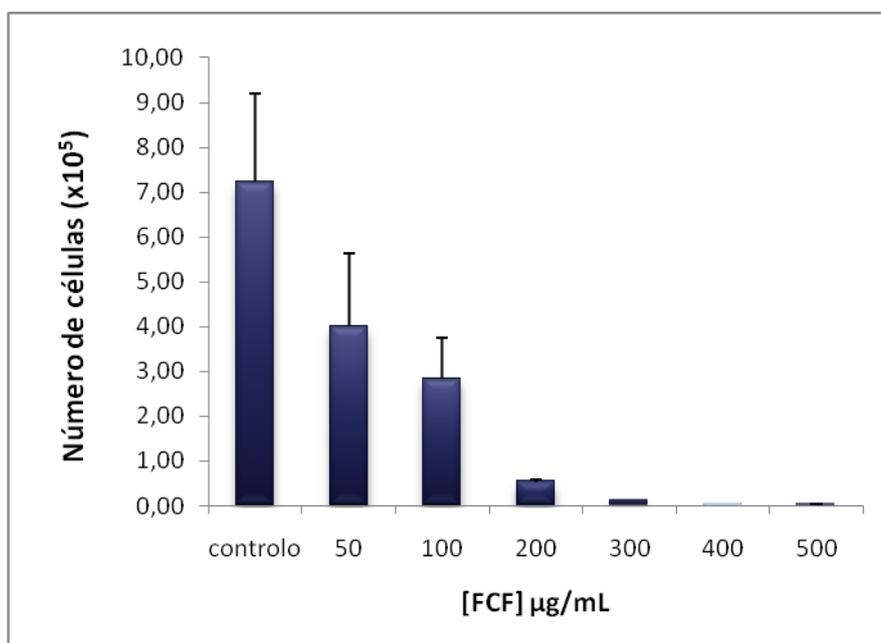


Figura 8 - Efeito das diferentes concentrações, 50-500 $\mu\text{g/ml}$, do extracto de folha de cardo cultivado fresco (FCF), 50-500 $\mu\text{g/ml}$, na proliferação das células HepG2.

Pela análise deste gráfico, figura 8, pode-se observar uma redução significativa do número total de células HepG2 após a incubação com o extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco, durante 48 horas. Este resultado levou-nos à hipótese de que os extractos de *Cynara cardunculus* poderiam ter um papel directo na regulação do ciclo celular.

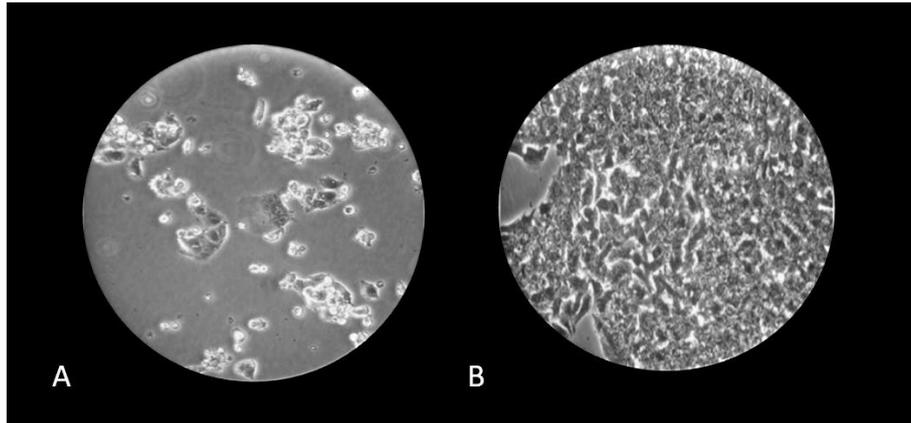


Figura 9 – Imagens de células HepG2 em cultura de monocamada obtidos no microscópio óptico invertido à ampliação de 100x. A – células não confluentes; B – células confluentes.

A figura 9 mostra as células HepG2 em culturas de monocamada em frascos de T25. Quando as células tornavam-se confluentes procedia-se à sua subcultura. As células HepG2 demoravam cerca de duas a três semanas para ficarem totalmente confluentes. Após a adição das diferentes concentrações de extracto, a confluência das células diminuía progressivamente, e muitas ficavam em suspensão.

A partir destes resultados foi então realizada com maior ênfase a avaliação do efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco na proliferação celular, na expressão dos genes $p21^{cip1/waf1}$ e $p27^{kip1}$, sendo estes marcadores do ciclo celular, e a análise do efeito deste extracto no ciclo celular por citometria de fluxo.

2. Efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco na proliferação de células HepG2

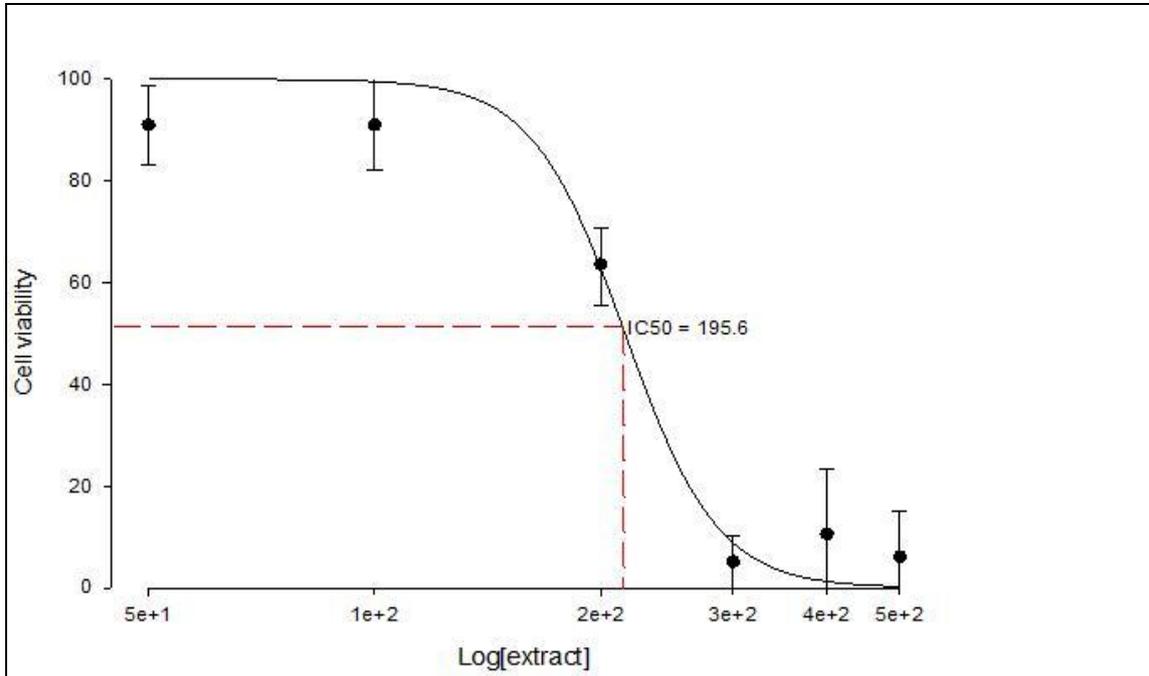


Figura 10 - Curva de viabilidade celular em células HepG2 tratadas com diferentes concentrações, 50-500 $\mu\text{g/ml}$, de extracto de folha de cardo cultivado fresco, durante 48h, obtida com o programa SigmaPlotGraphicObject.10 (n=4).

Foi estudado o efeito dos extractos de folha de *Cynara cardunculus* na proliferação das células de HepG2. Foram testadas diferentes concentrações, em peso seco, deste extracto (50-500 $\mu\text{g/ml}$). A figura 10 mostra que ocorre uma diminuição drástica da viabilidade celular aproximadamente a partir do logaritmo da concentração de 1×10^2 . O valor do IC_{50} foi de aproximadamente 195,6 $\mu\text{g/ml}$, em peso seco. A viabilidade celular manteve-se constante entre o logaritmo da concentração de $0,5 \times 10^2$ e 1×10^2 . A viabilidade celular baixou significativamente entre o logaritmo da concentração de 1×10^2 e 3×10^2 , baixando depois menos acentuadamente até 5×10^2 . As tabelas mais detalhadas encontram-se no Anexo III.

3. Efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco da expressão de p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} em células HepG2 e MDA-MB 231

Para analisar o efeito deste extracto na expressão dos marcadores celulares p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, realizou-se a extracção do RNA de acordo com o procedimento escrito no ponto 2.2.. Para determinar se o efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco inibe a progressão do ciclo celular em células HepG2, procedeu-se à análise da expressão dos genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}.

A figura 11 mostra o electroforetograma obtido a partir dos produtos de PCR com os dois primers em estudo, p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, e com a β -actina, sendo este o gene de referência. Através da análise do electroforetograma, pode-se observar que foram obtidos padrões de amplificação diferentes, consoante o primer utilizado. A partir do electroforetograma obtido foi realizada a quantificação dos genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} utilizando o programa Gel Doc XR.

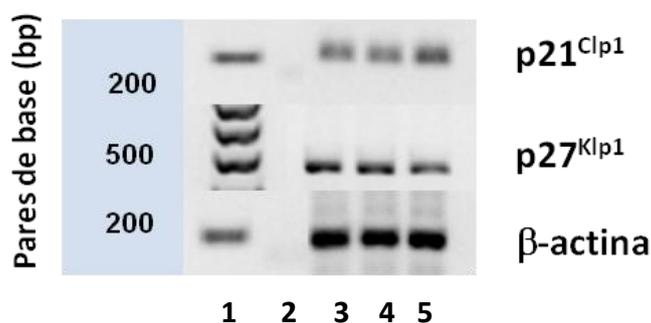


Figura 11 – Níveis de expressão para os genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} em células HepG2 incubadas durante 48h na presença de diferentes concentrações de extractos de cardo: caule cultivado fresco (CCF) ou extracto de folhas cultivadas frescas (FCF). Como gene de referência foi utilizada a expressão da β -actina.

1 – Padrões de DNA molecular 100 bp (Fermentas);

2 - Branco;

3 – células HepG2;

4 - CCF 200 μ g/mL;

5 - FCF 100 μ g/mL.

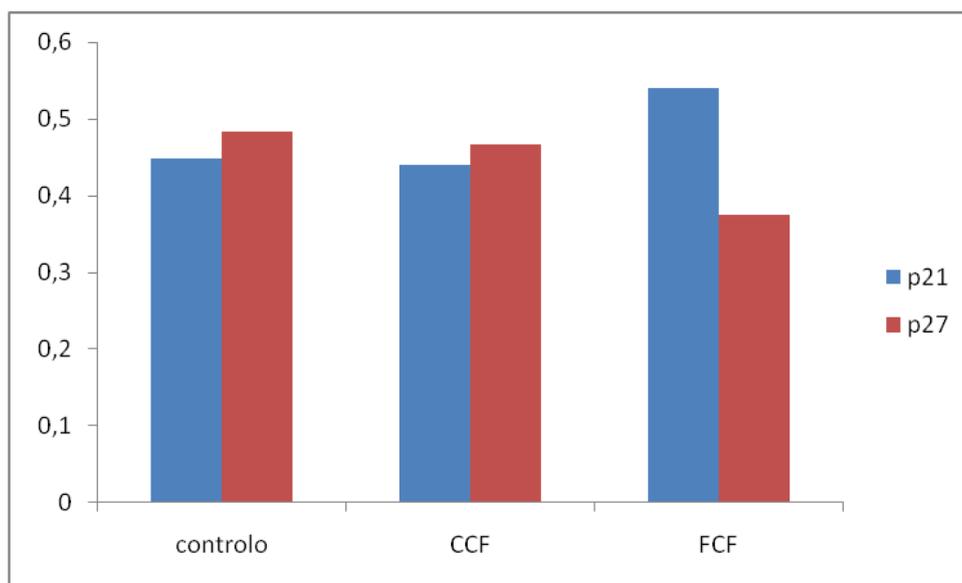


Figura 12 - (B) Análise densiométrica da expressão dos genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} nas células HepG2 tratadas com os extractos CCF, FCF e controlo (n=1).

A figura 12 representa o gráfico obtido a partir da quantificação dos genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}. Na figura 8 e 9, pode-se constatar que o extracto FCF (100 µg/ml) provocou um ligeiro aumento da expressão do gene p21^{CIP1/WAF1} e uma pequena diminuição da expressão do gene p27^{KIP1}, quando comparado com os níveis de expressão destes dois genes nas células controlo. O extracto do caule de cardo cultivado fresco não provocou alterações na expressão dos genes, sendo por isso considerado um controlo negativo.

Para determinar se o efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco inibe a progressão do ciclo celular em células MDA-MB 231, procedeu-se à análise da expressão dos genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}.

A figura 13 representa o electroforetograma obtido a partir dos produtos de PCR obtidos com os primers em estudo, p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, e com a β-actina, que foi o gene de referência. Pela análise global do electroforetograma pode-se constatar que foram gerados diferentes padrões de amplificação, consoante o *primer* utilizado (figura 10).

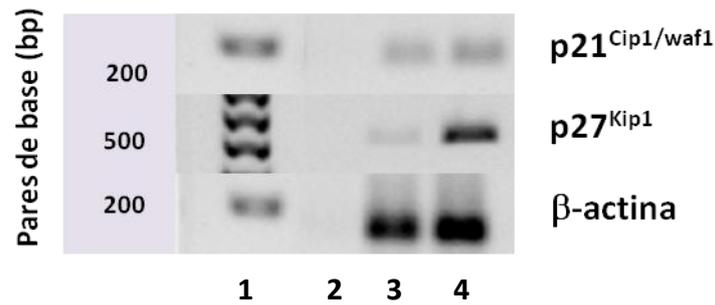


Figura 13 - Níveis de expressão para os genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} em células MDA-MB 231 incubadas durante 48h na presença de diferentes concentrações em fenóis de extracto de folhas de cardo cultivado fresco (FCF). Como gene de referência foi utilizada a expressão da β-actina.

1 - Padrões de DNA molecular 100 bp (Fermentas);
2 - branco;

3 - células MDA-MB 231;
4 - FCF 0,74μg/mL.

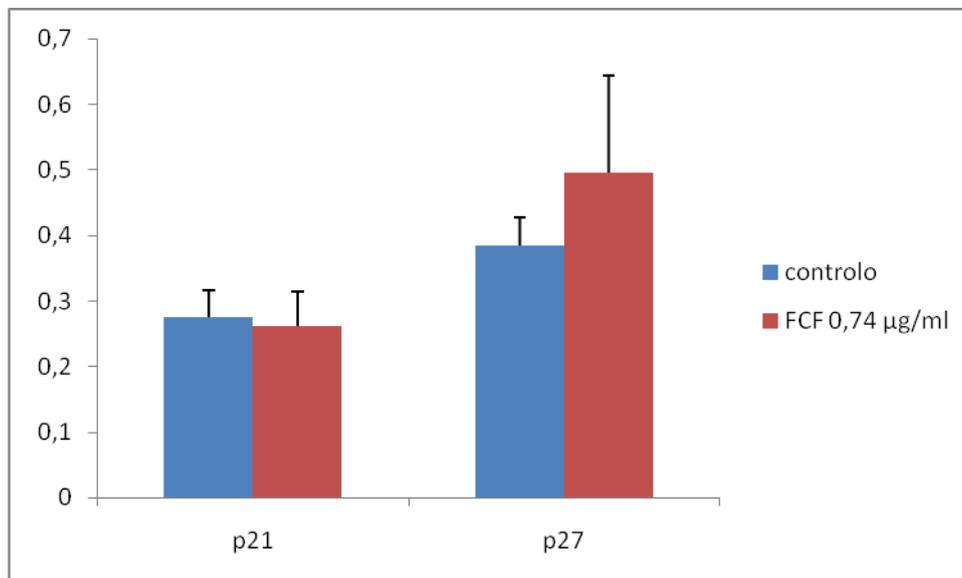


Figura 14 - Análise densiométrica da expressão dos genes p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} nas células MDA-MB 231 tratadas com o extracto FCF e controlo (n=3).

Na figura 14 encontra-se o gráfico obtido a partir da quantificação dos perfis moleculares obtidos através dos diferentes *primers* em estudo. A concentração de 0,74 $\mu\text{g/ml}$ corresponde ao valor de IC_{50} nesta linha celular. Pela análise densiométrica, pode-se constatar que a expressão do gene p27^{KIP1} aumentou nas células tratadas com o extracto de folha de cardo cultivado fresco. No entanto, a expressão do gene $\text{p21}^{\text{CIP1/WAF1}}$ nas células tratadas com este extracto manteve-se constante, quando comparado com as células controlo.

4. Efeito do extracto FCF na análise do ciclo celular de HepG2 por citometria de fluxo

4.1. Optimização da análise do ciclo celular utilizando linhas de células HepG2

Com o intuito de estudar a distribuição do ciclo celular das células HepG2, procedeu-se à optimização deste método. Para tal, como podemos ver pela figura 15 escolhemos o nível de detecção de radiação frontal E-1, uma vez que era o nível emitia uma maior fluorescência.

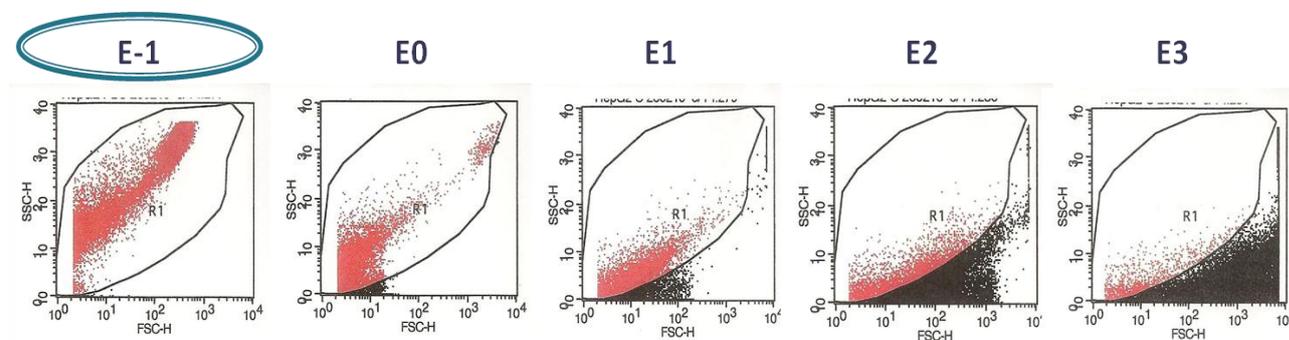


Figura 15 – Gráficos de densidades representativos dos núcleos das células HepG2 (controlo) em diferentes níveis de fluorescência (E-1; E0; E1; E2; E3).

Após a escolha do nível de fluorescência, procedeu-se à escolha do canal de fluorescência e do número de eventos por segundo a registar. Foi seleccionado o canal de fluorescência FL3 por emitir maior fluorescência.

Para a aquisição das amostras foi utilizado o programa Cell Quest e para a análise o programa WinMDI2.8. Foram adquiridos 25 000 eventos totais de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula, através de dois parâmetros, dispersões frontal e

lateral de luz, que representam, respectivamente, tamanho (FSC) e complexidade (SSC-H).

4.2. Análise fluorocitométrica do efeito dos extractos na distribuição ciclo celular

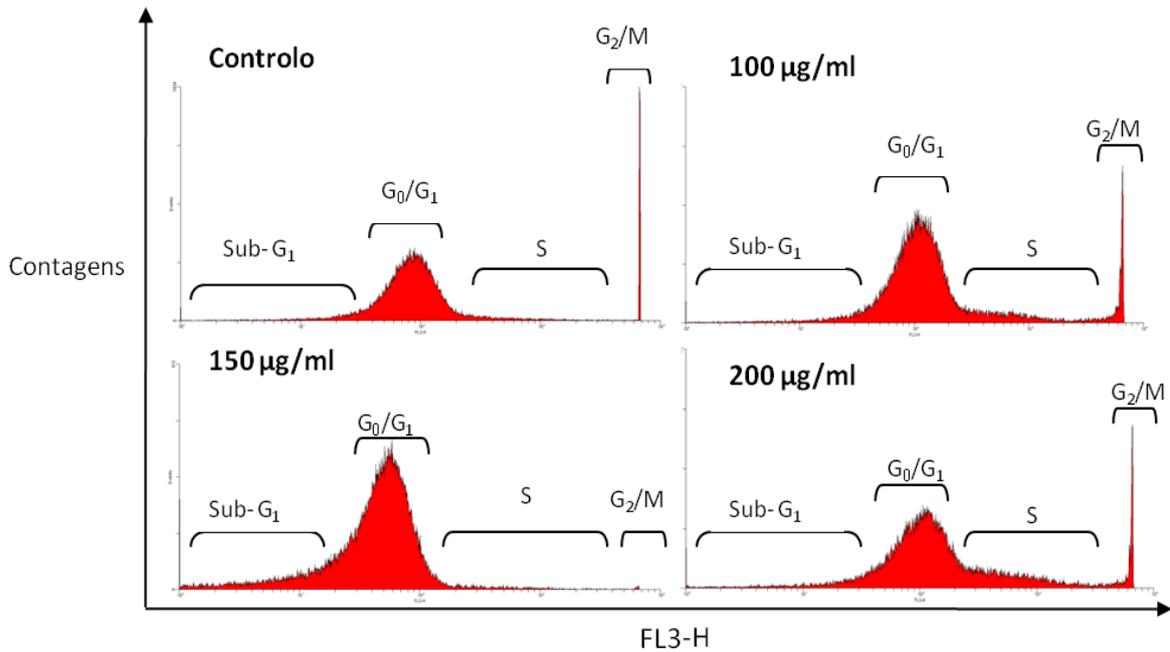


Figura 16 – Histogramas de fluorescência representativos da citometria de fluxo de células tumorais HepG2 não tratadas (controlo) e de células tratadas com diferentes concentrações de extracto (100; 150 e 200 µg/mL).

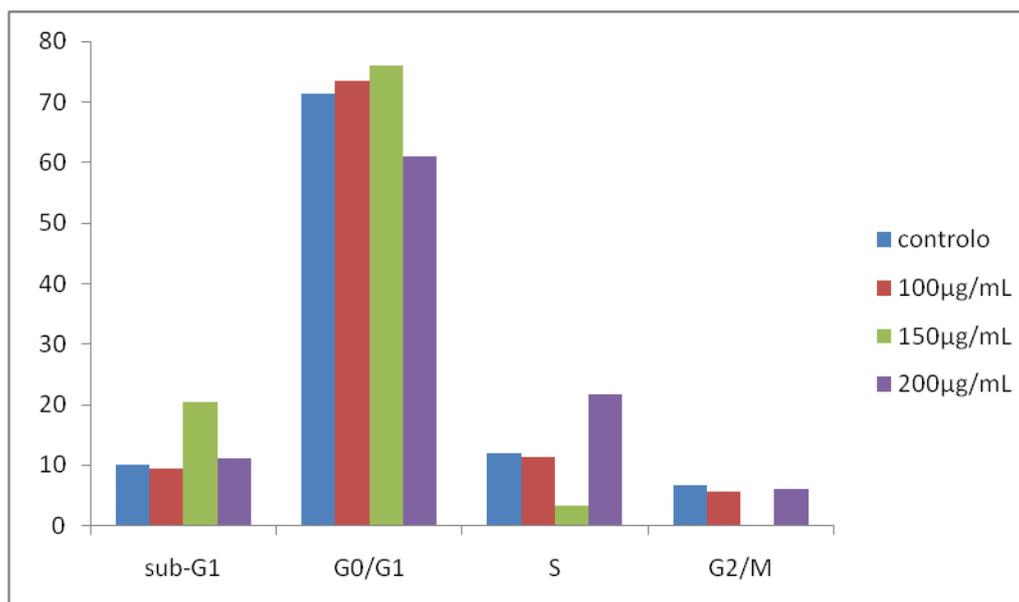


Figura 17 - Efeito do extracto metanólico da folha de cardo cultivado fresco na distribuição do ciclo celular das células HepG2 (n=1).

Tabela 1 - Distribuição percentual do número total de células tumorais HepG2 submetidas a apoptose (sub-G₁) e em diferentes fases do ciclo celular, tratadas com três tipos de concentrações em peso seco de extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco (100; 150 e 200 µg/mL) (n=1).

	sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
controle	10,06	71,41	11,88	6,65
100µg/mL	9,35	73,58	11,35	5,72
150µg/mL	20,53	75,96	3,37	0,14
200µg/mL	11,17	61,1	21,71	6,02

Foi realizado o estudo da distribuição do ciclo celular em células HepG2 incubadas com diferentes concentrações em peso seco (100; 150 e 200 µg/mL) de extracto metanólico de *Cynara cardunculus*, durante 48 horas. A figura 16 mostra os histogramas obtidos a partir do programa WinMDI2.8, onde os núcleos estão distribuídos em função da intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo (PI), mostrando os percentuais relativos dos núcleos em cada fase do ciclo celular. A primeira área seleccionada corresponde à sub-fase G₁, representado as células com DNA fragmentado, o primeiro pico corresponde às células na fase G₀/G₁, a região em plateau corresponde à fase S e o segundo pico à fase G₂/M. Através da análise dos dados da figura 17 e da tabela 1

pode-se constatar um aumento da sub-fase G_1 em células tratadas com a concentração de 150 $\mu\text{g/ml}$. No entanto, a distribuição percentual de células nesta fase diminuiu em células incubadas com a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$. A proporção de células na fase G_0/G_1 aumentou com as concentrações de 100 e 150 $\mu\text{g/ml}$, diminuindo com a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$. Pode-se constatar uma diminuição significativa da proporção de células nas fases S e G_2/M a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. Todavia, com a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ a distribuição percentual de células voltou a aumentar significativamente nestas duas fases.

O extracto metanólico proveniente da folha de *Cynara cardunculus*, com concentrações inferiores ao IC_{50} (100 e 150 $\mu\text{g/mL}$) revelou-se um inibidor das fases S e G_2/M . Além disso, para a concentração de 150 $\mu\text{g/ml}$ ocorreu um aumento significativo de células na sub-fase G_1 . É de salientar que as células na sub-fase G_1 encontram-se com o DNA fragmentado, estando por isso em apoptose. O aumento das fases S e G_2/M e diminuição da fase G_0/G_1 com a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$, pode ser devido à presença de flavenóides que induzem um aumento da fase G_2/M .

Na figura 18, observa-se a distribuição de núcleos em função da complexidade e tamanho, após a incubação das células na ausência (controlo) e presença de extracto.

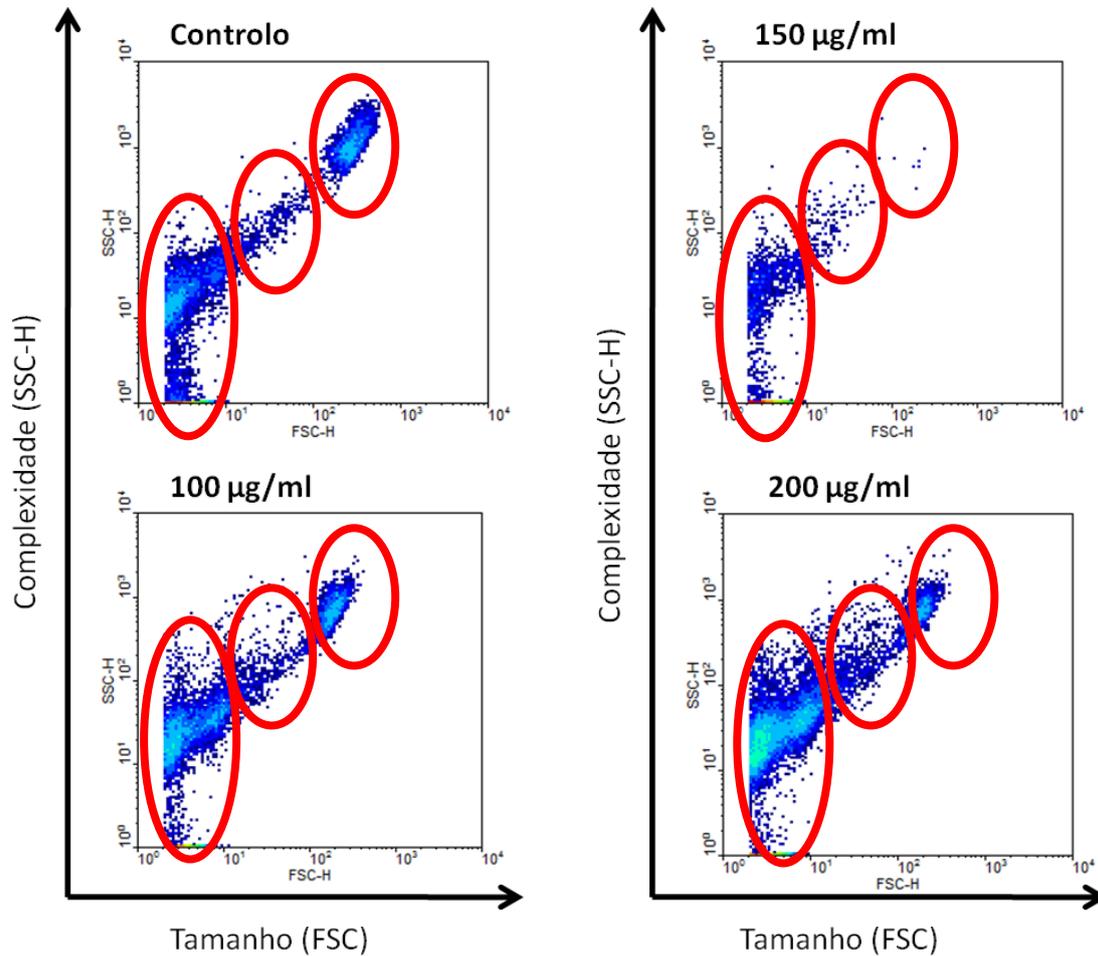


Figura 18 – Gráficos de densidades dos núcleos das células HepG2 após o tratamento com diferentes concentrações em peso seco do extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco.

As células que não foram incubadas com extracto apresentam uma região grande com um número de núcleos com tamanho normal, uma região com um número mais reduzido de núcleos com dimensões intermédias e outra região com núcleos contendo o dobro do tamanho e com uma maior complexidade. As células tratadas com as concentrações 100 e 150 µg/ml de extracto de folha de cardo cultivado fresco apresentam uma redução do número de núcleos nestas três regiões citadas. No entanto, observou-se um aumento do número de núcleos nestas três regiões em células tratadas com a concentração de 200 µg/ml deste extracto.

A distribuição do ciclo celular em células MDA-MB-231 foi estudada após a exposição do extracto metanólico de *Cynara cardunculus* a uma concentração inferior, igual e superior à concentração do IC₅₀, durante 48 horas.

A figura 19 mostra os histogramas obtidos a partir do programa WinMDI2.8, onde os núcleos estão distribuídos em função da intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo (PI), mostrando a distribuição percentual relativa dos núcleos em cada fase do ciclo celular.

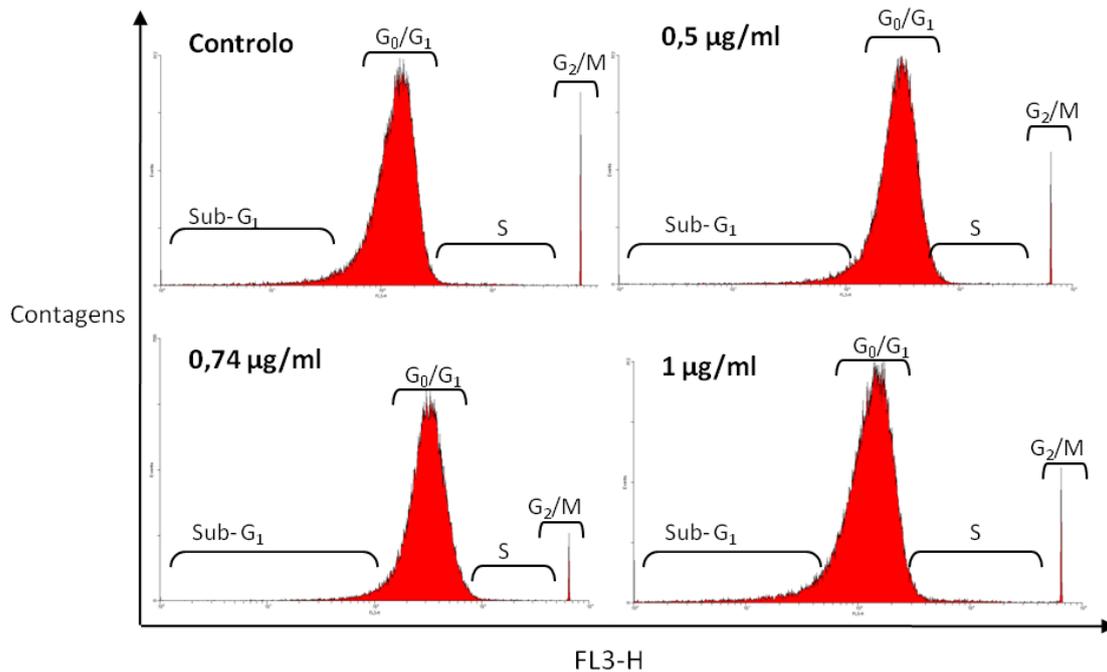


Figura 19 – Histogramas de fluorescência representativos da citometria de fluxo de células tumorais MDA-MB-231 não tratadas (controlo) e de células tratadas com diferentes concentrações de extracto (0,5; 0,74 e 1 µg/mL).

A primeira área seleccionada corresponde à sub-fase G₁, representado as células com DNA fragmentado, o primeiro pico corresponde às células na fase G₀/G₁, a região em plateau corresponde à fase S e o segundo pico à fase G₂/M.

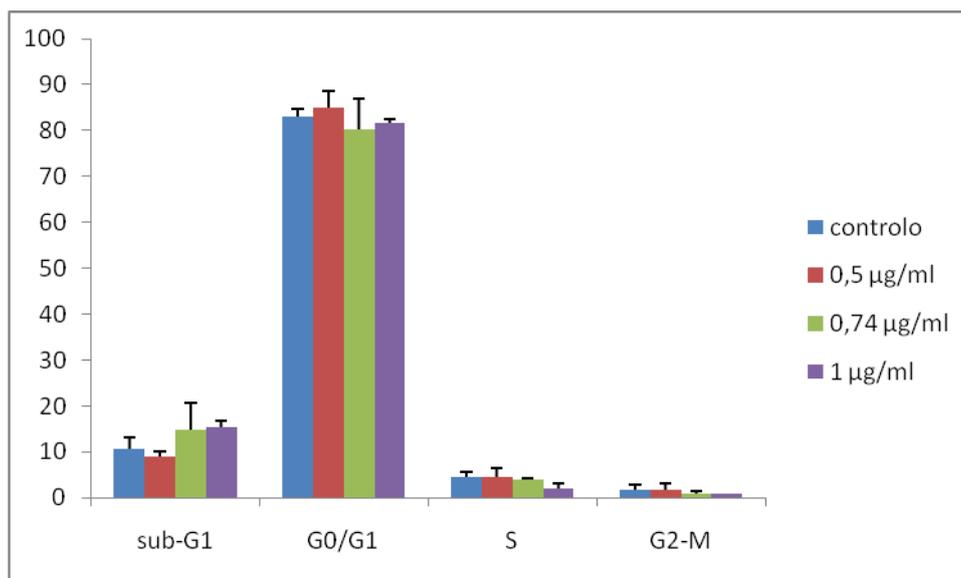


Figura 20 – Gráfico representativo do efeito do extracto metanólico da folha de cardo cultivado fresco na distribuição do ciclo celular das células MDA-MB 231 (n=3).

Tabela 2 - Distribuição percentual do número total de células tumorais MDA-MB-231 submetidas a apoptose (sub-G₁) e em diferentes fases do ciclo celular, tratadas com três tipos de concentrações em compostos fenólicos de extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco (0,5; 0,74 e 1 µg/mL).

	sub-G1	G0/G1	S	G2-M
controlo	10,64333 ± 2,56	83,28667 ± 1,612	4,476667 ± 1,237	1,656667 ± 1,188
0,5 µg/ml	8,883333 ± 1,275	84,86333 ± 3,478	4,66 ± 2,179	2,196667 ± 1,310
0,74 µg/ml	14,83667 ± 5,956	80,14667 ± 6,774	4,223333 ± 0,299	0,99 ± 0,528
1 µg/ml	15,51667 ± 1,165	81,59333 ± 1,006	3,676667 ± 1,139	0,883333 ± 0,095

Na figura 20 e na tabela 2 pode-se observar um aumento da fase G₀/G₁ com a concentração de 0,5 µg/ml e de 1 µg/ml, mas houve uma ligeira diminuição percentual de células nesta fase com a concentração de 0,74 µg/ml. A proporção de células nas fases S e G₂/M diminuiu a partir da concentração de 0,74 µg/ml, quando comparado com o controlo e com as células tratadas com a concentração de 0,5 µg/ml. Pode-se observar um aumento significativo de células, tratadas com as concentrações de 0,74 µg/ml e 1 µg/ml, em apoptose (sub-G₁). O tratamento estatístico mais detalhado encontra-se no anexo IV.

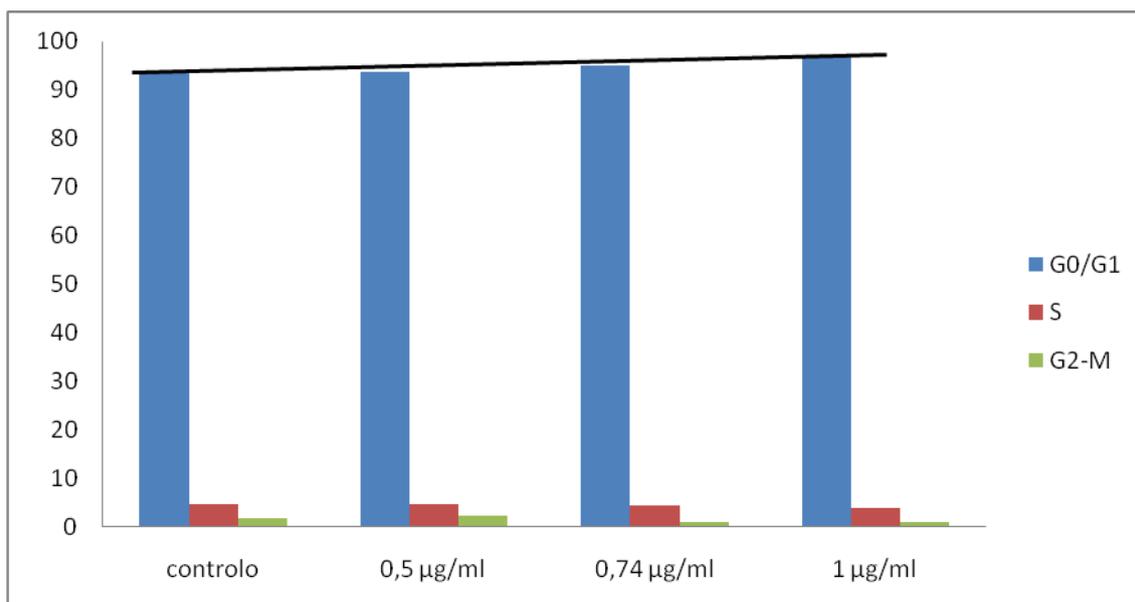


Figura 21 – Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular das células MDA-MB 231, incubadas com o extracto de folha de cardo cultivado fresco, com as concentrações de 0,5; 0,74 e 1 µg/ml.

A figura 21 mostra o gráfico representativo da distribuição do ciclo celular das células MDA-MB 231, em que se pode observar um aumento da fase G₀/G₁ à medida que se aumenta a concentração do extracto de folha de cardo cultivado. Este extracto, com a concentração mais baixa, causou uma acumulação de células na fase G₀/G₁ e G₂/M e uma diminuição da proporção de células na fase sub-G₁. No entanto, com concentrações mais elevadas, 0,74 µg/ml e 1 µg/ml, provocou uma paragem do ciclo celular na fase G₀/G₁ e um aumento substancial na proporção de células na sub-fase G₁. Este aumento de células na sub-G₁ pode reflectir a indução da apoptose. Estes locais de acção no ciclo celular são similares aos compostos fenólicos (e compostos relacionados) presentes nesta espécie. Vários estudos referem que flavenóides induzem a paragem do ciclo celular na fase G₂/M, ao passo que os ácidos cafeoilquinicos induzem a paragem do ciclo na fase G₀/G₁ (Mohd Fadzelly Abu Bakar 2010).

Na figura 22, pode-se observar a distribuição dos núcleos em função da complexidade e tamanho, após a incubação das células MDA-MB 231 com diferentes concentrações em compostos fenólicos do extracto metanólico de folha de cardo cultivado fresco e em células controlo.

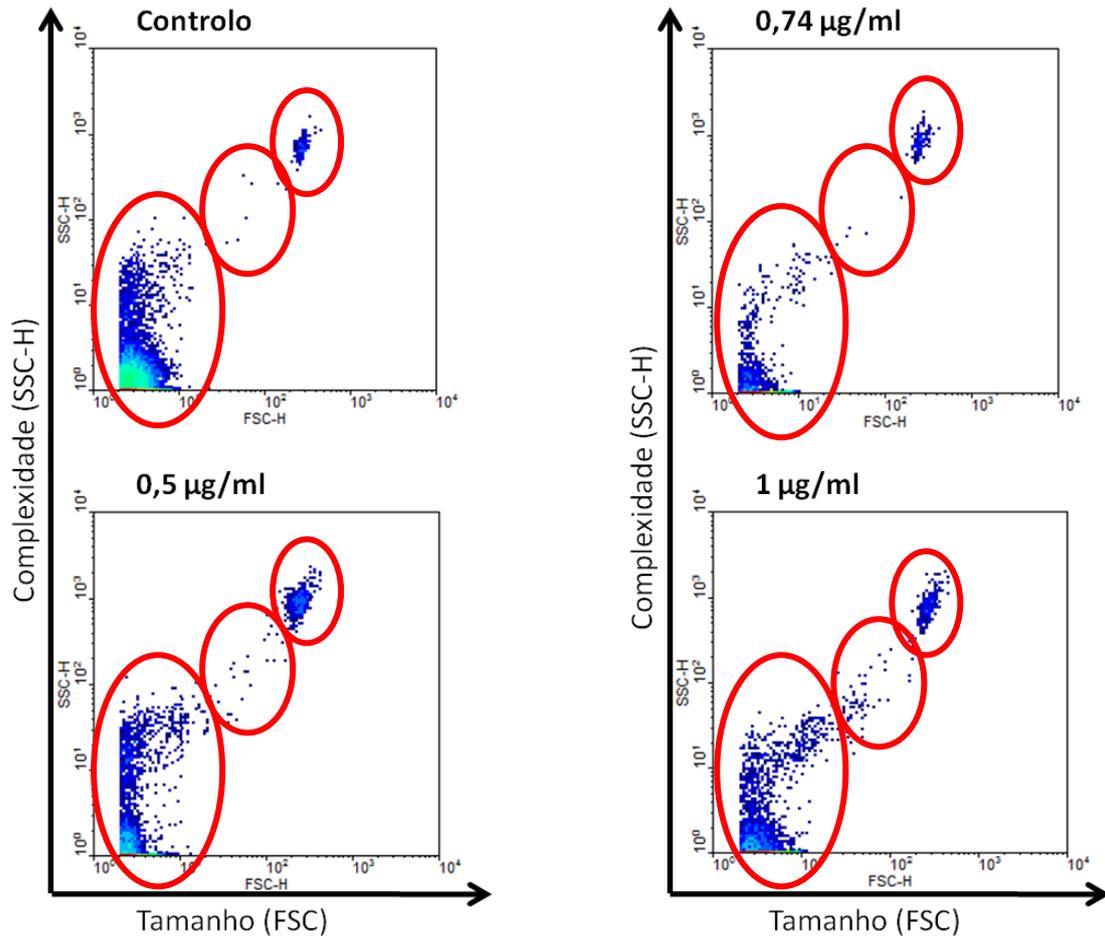


Figura 22 – Gráficos de densidades dos núcleos das células MDA-MB após o tratamento com diferentes concentrações em compostos fenólicos do extracto de folha de cardo cultivado fresco.

As células que serviram de controlo apresentam uma região grande com um número de núcleos com tamanho normal, uma região com um número mais reduzido de núcleos com dimensões intermédias e outra região com núcleos contendo o dobro do tamanho e com uma maior complexidade. As células tratadas com as diferentes concentrações de extracto de folha de cardo cultivado fresco apresentam uma redução do número de núcleos nestas três regiões citadas.

5. Considerações finais

Em suma, de um modo geral os resultados mostraram que o extracto de folha de cardo cultivado fresco teve um efeito inibidor na proliferação celular de HepG2, tendo então um efeito directo no ciclo celular.

A partir do estudo do efeito do extracto de folha de cardo cultivado fresco, realizou-se a determinação do IC₅₀ em células HepG2, tendo o valor de aproximadamente 195,6 µg/ml, em peso seco.

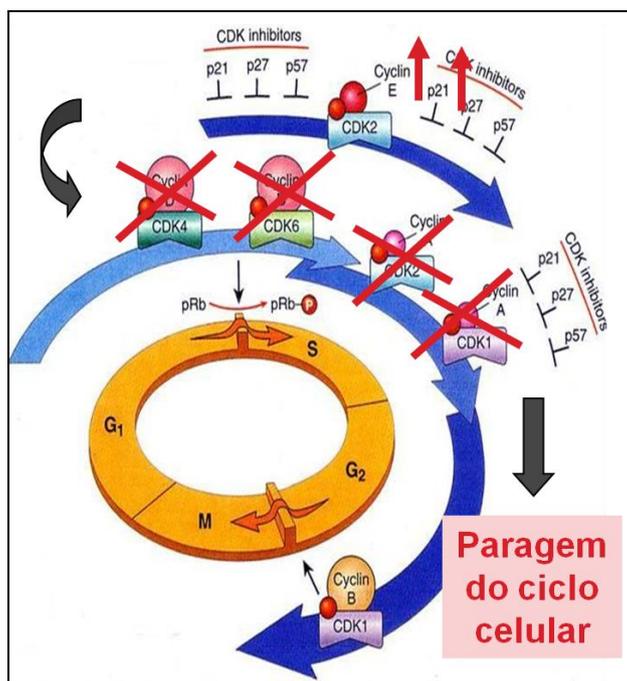


Figura 23 - As principais CDK em cada fase do ciclo celular, e os seus inibidores correspondentes.
<http://homepage.mac.com/enognog/checkpoint.htm>

A técnica de RT-PCR foi realizada com o intuito de analisar a expressão genética dos inibidores celulares p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}. De acordo com os resultados obtidos por RT-PCR, pode-se verificar que as células HepG2 incubadas com FCF (100µg/mL), durante 48h, apresentam uma expressão aumentada do marcador p21^{CIP1/WAF1}. Enquanto nas células MDA-MB 231 a expressão do marcador celular p27^{KIP1} estava mais aumentada do que a expressão do marcador celular p21^{CIP1/WAF1}.

A técnica de citometria de fluxo provou ser uma ferramenta de grande importância na análise da distribuição do ciclo celular das células HepG2 e MDA-MB 231. Com esta técnica pode-se concluir que o extracto de folha de cardo cultivado fresco induziu um aumento da fase G₁, e simultaneamente uma diminuição das fases S e G₂, provocando a paragem do ciclo celular.

6. Perspectivas futuras

No futuro desenvolvimento deste trabalho seria interessante proceder à análise de novos marcadores do ciclo celular na técnica de RT-PCR, de modo a determinar com maior ênfase o efeito destes extractos no ciclo celular.

Em estudo futuros poder-se-á utilizar a técnica de Western blot, para estudar a expressão a nível proteico dos marcadores do ciclo celular nas células de HepG2.

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, seria vantajoso que efectuar um estudo relativo ao efeito de cada constituinte dos extractos da *Cynara cardunculus* nas células de HepG2, através de por exemplo, de técnicas de RT-PCR, citometria de fluxo e de Western blot.

7. Referências Bibliográficas

- ✓ Avila, M. A., C. Berasain, et al. (2006). "New therapies for hepatocellular carcinoma." Oncogene **25**(27): 3866-3884.
- ✓ Bezáková, L., D. Grancai, et al. (2007). "Effects of flavonoids and cynarine from *Cynara cardunculus* L. on lipoxygenase activity." Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae **Tomus LIV**: 48-52.
- ✓ Bruix, J., A. J. Hessheimer, et al. (2006). "New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma." Oncogene **25**(27): 3848-3856.
- ✓ Bruix, J., M. Sherman, et al. (2001). "Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver." Journal of Hepatology **35**(3): 421-430.
- ✓ Coleman, W. B. (2003). "Mechanisms of human hepatocarcinogenesis." Current Molecular Medicine **3**(6): 573-588.
- ✓ Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" TRENDS in Cell Biology **13**(2): 65-70.
- ✓ This article discusses recent insights into these possible additional functions of p21 and p27.
- ✓ El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology **132**(7): 2557-2576.
- ✓ Fabregat, I. (2009). "Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells." World Journal of Gastroenterology **15**(5): 513-520.
- ✓ Falleh, H., R. Ksouri, et al. (2008). "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities." C R Biologies **331**(5): 372-379.
- ✓ Feitelson, M. A., B. Sun, et al. (2002). "Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis." Oncogene **21**(16): 2593-2604.
- ✓ Fernández, J., M. D. Curt, et al. (2006). "Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses." Industrial Crops and Products **24**(3): 222-229.

- ✓ Garg, A. K., T. A. Buchholz, et al. (2005). "Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols." *Antioxidants & Redox Signaling* **7**(11-12): 1630-1647.
- ✓ Hemalswarya, S. and M. Doble (2006). "Potential synergism of natural products in the treatment of cancer." *Phytotherapy Research* **20**(4): 239-249.
- ✓ Kojiro, M. and T. Roskams (2005). "Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules." *Seminars in Liver Disease* **25**(2): 133-142.
- ✓ Kukic, J., V. Popovic, et al. (2008). "Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts." *Food Chemistry* **107**(2): 861-868.
- ✓ Matsuda, Y. (2008). "Molecular mechanism underlying the functional loss of cyclindependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma." *World J Gastroenterol* **14**(11): 1734-1740.
- ✓ Mohd Fadzelly Abu Bakar, M. M., Asmah Rahmat, Steven A. Burr, Jeffrey R. Fry (2010). "Cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cell lines exposed to an extract of the seed kernel of *Mangifera pajang* (bambangan)." *Food and Chemical Toxicology*(48): 1688–1697.
- ✓ Park, A. M. A. a. B. H. (2009). "p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance." *Expert Rev Mol Med* **10**(19): 1-19.
- ✓ Roberts, L. R. and G. J. Gores (2005). "Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets." *Seminars in Liver Disease* **25**(2): 212-225.
- ✓ Semela, D. and J. F. Dufour (2004). "Angiogenesis and hepatocellular carcinoma." *Journal of Hepatology* **41**(5): 864-880.
- ✓ Shariff MI, C. I., Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD (2009). "Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics." *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **3**(4): 353-367.
- ✓ Thorgeirsson, S. S. and J. W. Grisham (2002). "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma." *Nature Genetics* **31**(4): 339-346.
- ✓ Yasuhiro Ito, N. M., Masato Sakon, Eiji Miyoshi, Katsuhisa Noda, Tsutomu Takeda, Koji Umeshita,, S. N. Hiroyuki Nagano, Keizo Dono, Masahiko Tsujimoto, Masaaki Nakahara, Kazuyasu Nakao,, et al. (1999). "Expression and Prognostic Roles of the G1-S Modulators in Hepatocellular Carcinoma: p27 Independently Predicts the Recurrence." *Hepatology* **30**(1): 90-99.

Anexo I

Protocolo Experimental:

- Extracção de RNA com digestão do DNA por acção da DNase I utilizando o kit “RNeasy Mini” (Qiagen)

- 1) Romper as células com o tampão RTL contendo β -mercaptoetanol 10% (V/V). Com o número de células é inferior a 5×10^6 , então adiciona-se 350 μ l do tampão mencionado e homogeneiza-se por pipetagem;
- 2) Adicionar 1 volume de etanol 70% ao lisado homogeneizado e misturar bem por pipetagem. Não centrifugar;
- 3) Transferir até 700 μ l de amostra, incluindo algum precipitado, para uma coluna “RNeasy Spin” colocada num tubo de recolha de 2 ml. Fechar a tampa e centrifugar durante 15 segundos a 12000 rpm. Desprezar o líquido. Reutilizar o tubo de recolha.
- 4) Digestão do DNA com a DNase I:
 - 4.1) Adicionar 35 μ l do tampão RW1 à coluna. Fechar a tampa e centrifugar durante 15 segundos a 12000 rpm para lavar a coluna. Desprezar o líquido. Reutilizar o tubo de recolha;
 - 4.2) Adicionar 10 μ l de solução de DNase I a 70 μ l de tampão RDD. Misturar por inversão do tubo;
 - 4.3) Adicionar a solução de DNase I em tampão RDD (80 μ l) directamente na coluna, e aguardar à temperatura ambiente durante 15-20 minutos.
Nota: Adicionar a solução de DNase I em tampão RDD directamente na coluna. A digestão por acção da DNase será incompleta se parte da mistura ficar aderente às paredes do anel-O da coluna.
 - 4.4) Adicionar 350 μ l do tampão RW1 à coluna. Fechar a tampa, e centrifugar durante 15 segundos a 12000 rpm. Desprezar o líquido. Reutilizar o tubo de recolha. Após a centrifugação, remover a coluna com cuidado de modo a que não esteja em contacto com o líquido.

- 5) Adicionar 500µl do tampão RPE à coluna. Fechar a tampa e centrifugar durante 15 segundos a 12000 rpm para lavar a membrana. Desprezar o líquido. Reutilizar o tubo de recolha;
- 6) Adicionar 500µl do tampão RPE à coluna. Fechar a tampa e centrifugar durante 2 minutos a 12000 rpm. Desprezar o líquido;
- 7) Colocar a coluna num novo tubo de recolha. Fechar a tampa e centrifugar durante 1 minuto à velocidade máxima (134000 rpm). Desprezar o líquido;
- 8) Colocar a coluna num microtubo de 1,5 ml. Adicionar 30 a 50 µl de água sem RNase directamente na coluna. Fechar a tampa e centrifugar durante 1 minuto a 12000 rpm. Proceder a 4 eluições com recolhas conjuntas de duas em duas eluições;
- 9) Conservar as fracções eluídas a -80°C.

Síntese de cDNA

Procedimento experimental:

Os reagentes do kit são descongelados no gelo. Enquanto se prepara a mistura reaccional, descongelar e conservar o RNA no gelo para minimizar o risco de degradação.

- 1) Misturar os reagentes em gelo. Adicionar o volume de amostra de RNA necessário de modo a que a massa seja igual a 1 µg.

<u>Reagente</u>	<u>Volume</u>
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free water	x µl
Amostra de RNA (100 pg a 1 µg RNA total)	x µl
	<hr style="width: 50px; margin-left: auto; margin-right: 0;"/>
	20 µl

2) Incubar a mistura reaccional no termociclador:

5 minutos a 25°C

30 minutos a 42°C

5 minutos a 85°C

∞ a 4°C (opcional)

3) Guardar as amostras de cDNA a -20°C.

Anexo II

Protocolos utilizados para a citometria de fluxo com as células HepG2:

1. Plaquear as células HepG2 em frascos T25;
2. Após 24 horas, incubar as células HepG2 com várias concentrações de extracto de folha de cardo cultivado fresco (FCF) durante 48 horas, a 37°C, 5% CO₂. Fazer controlo das 48h só com o meio de cultura e fazer o controlo com células incubadas com o meio de cultura sem soro (FBS) durante 18 horas.
3. tripsinizar as células, tendo o cuidado de ressuspender muito bem as as células no meio;
4. ter em atenção que o número de células deverá rondar 1x10⁶ cells/ml (fazer as pellets em eppendorfs);
5. centrifugar as células, 3 min a 2500rpm 4°C, e ressuspender cuidadosamente a pellet de células em 1ml de PBS 1x gelado, repetir esta lavagem duas vezes (com centrifugação incluída). Remover o supernadante;
6. fixar as células em etanol a 1 ml de 70% gelado durante 30 minutos (manter os tubos em gelo);
7. guardar a 4°C protegido da luz, até à utilização das amostras;
8. no dia da leitura, centrifugar as pellets celulares a 12000 rpm durante 2 min;
9. aspirar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de tampão citrato;
10. fazer de seguida uma diluição de 1:10 para um tubo de citómetro e observar o número de eventos;
11. de acordo com o número de eventos observados (entre 100 a 200) fazer uma nova diluição a partir do original (ponto 7) e adicionar 25µl PI (50 µg/ml) mais 3µl Triton X-100 a 0,3% (3µl);
12. incubar 15 minutos ao abrigo da luz, temperatura ambiente
13. Adicionar 5µl RNase (100 µg/ml);
14. incubar 15 minutos ao abrigo da luz, temperatura ambiente

Protocolo experimental para a citometria de fluxo com as células MDA-MB 231

1. Plaquear as células HepG2 em frascos T25;
2. Após 24 horas, incubar as células HepG2 com várias concentrações de extracto de folha de cardo cultivado fresco (FCF) durante 48 horas, a 37°C, 5% CO₂. Fazer controlo das 48h só com o meio de cultura e fazer o controlo com células incubadas com o meio de cultura sem soro (FBS) durante 18 horas.
3. tripsinizar as células, tendo o cuidado de ressuspender muito bem as as células no meio;
4. ter em atenção que o número de células deverá rondar 1x10⁶ cells/ml (fazer as pellets em eppendorfs);
5. centrifugar as células, 3 min a 2500rpm 4°C, e ressuspender cuidadosamente a pellet de células em 1ml de PBS 1x gelado, repetir esta lavagem duas vezes (com centrifugação incluída). Remover o supernadante;
6. fixar as células em etanol a 1 ml de 70% gelado durante 30 minutos (manter os tubos em gelo);
7. guardar a 4°C protegido da luz, até à utilização das amostras;
8. no dia da leitura, centrifugar as pellets celulares a 12000 rpm durante 2 min;
9. aspirar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de tampão citrato;
10. fazer de seguida uma diluição de 1:10 para um tubo de citómetro e observar o número de eventos;
11. de acordo com o número de eventos observados (entre 100 a 200) fazer uma nova diluição a partir do original (ponto 7) e adicionar 25µl PI (50 µg/ml) mais 3µl Triton X-100 a 0,3% (3µl);
12. incubar 15 minutos ao abrigo da luz, temperatura ambiente
13. Adicionar 5µl RNase (100 µg/ml);
14. incubar 15 minutos ao abrigo da luz, temperatura ambiente

Anexo III

Tabela 3 – Percentagem de citotoxicidade das células HepG2

µg/ml	I B	II B	III B	IV B	I C	II C	III C	IV C
Control	0,000129	0,000354	0,000321	0,000365	5,940594	9,708738	11,21495	10,29412
50	16,36364	8	14,28571	9,615385	25	14,54545	8,695652	11,2
100	3,225806	4,273504	4,395604	6,976744	33,84615	13,69863	15,78947	22,64151
200	14,7541	9,459459	11,11111	11,66667	70,58824	67,74194	56	64,70588
300	100	100	100	96,2963	93,33333	92	87,5	93,54839
400	100	100	100	100	82,22222	71,42857	90,40249	79,16667
500	100	100	100	96,42857	82,35294	80	100	96,15385

Tabela 4 – Percentagem de viabilidade celular das células HepG2

µg/ml	I B	II B	III B	IV B	I C	II C	III C	IV C
Control	99,99987	99,99965	99,99968	99,99964	94,05941	90,29126	88,78505	89,70588
50	83,63636	92	85,71429	90,38462	75	85,45455	91,30435	88,8
100	96,77419	95,7265	95,6044	93,02326	66,15385	86,30137	84,21053	77,35849
200	85,2459	90,54054	88,88889	88,33333	29,41176	32,25806	44	35,29412
300	0	0	0	3,703704	6,666667	8	12,5	6,451613
400	0	0	0	0	17,77778	28,57143	9,597506	20,83333
500	0	0	0	3,571429	17,64706	20	0	3,846154

Tabela 5 – Cálculo do IC₅₀ das células HepG2

µg/ml	I B	II B	III B	IV B	I C	II C	III C	IV C	Average	SEM
50	83,63647	92,00033	85,71456	90,38494	79,73684	94,64321	102,8375	98,99016	90,99301	7,816077
100	96,77432	95,72683	95,6047	93,02359	70,33198	95,58109	94,84765	86,23569	91,01573	8,997128
200	85,24601	90,54086	88,88917	88,33366	31,26935	35,72667	49,55789	39,34426	63,61349	26,86838
300	0	0	0	3,703717	7,087719	8,860215	14,07895	7,191962	5,11532	5,113927
400	0	0	0	0	18,90058	31,64363	10,80982	23,22404	10,57226	12,65238
500	0	0	0	3,571442	18,76161	22,15054	0	4,287516	6,096388	9,074727
IC 50	210,3685	213,765	212,5806	233,6412	134,8769	185,9094	199,2262	174,4621	195,6037	30,53034
Hill coef	-34,7035	-33,9359	-34,0876	-13,0185	-1,7309	-2,4324	-4,0558	-2,9835	-15,8685	15,61689

Anexo IV

Tratamento estatístico, obtido através do programa SPSS, dos resultados da citometria de fluxo em células MDA-MB 231

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
SubG1	,00	3	10,6433	2,56028	1,47818	4,2832	17,0034	8,34	13,40
	,50	3	8,8833	1,27500	,73612	5,7160	12,0506	7,97	10,34
	,74	3	14,8367	5,95653	3,43900	,0398	29,6335	10,00	21,49
	1,00	3	15,5167	1,16573	,67304	12,6208	18,4125	14,29	16,61
	Total	12	12,4700	4,08202	1,17838	9,8764	15,0636	7,97	21,49
G0G1	,00	3	83,0633	1,61296	,93124	79,0565	87,0701	81,74	84,86
	,50	3	85,0100	3,47823	2,00816	76,3696	93,6504	82,81	89,02
	,74	3	80,2667	6,77423	3,91111	63,4385	97,0948	72,67	85,68
	1,00	3	81,5933	1,00650	,58110	79,0931	84,0936	80,62	82,63
	Total	12	82,4833	3,81962	1,10263	80,0565	84,9102	72,67	89,02
S	,00	3	4,4767	1,23715	,71427	1,4034	7,5499	3,59	5,89
	,50	3	4,4167	2,17955	1,25836	-,9976	9,8310	1,90	5,69
	,74	3	3,9067	,29956	,17295	3,1625	4,6508	3,66	4,24
	1,00	3	2,0067	1,13949	,65788	-,8240	4,8373	,93	3,20
	Total	12	3,7017	1,57881	,45576	2,6985	4,7048	,93	5,89
G2M	,00	3	1,8167	1,18837	,68611	-,1354	4,7688	1,00	3,18
	,50	3	1,6900	1,31011	,75639	-,15645	4,9445	,77	3,19
	,74	3	,9900	,52887	,30534	-,3238	2,3038	,66	1,60
	1,00	3	,8833	,09504	,05487	,6472	1,1194	,79	,98
	Total	12	1,3450	,89832	,25932	,7742	1,9158	,66	3,19

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SubG1	Between Groups	93,253	3	31,084	2,762	,111
	Within Groups	90,040	8	11,255		
	Total	183,292	11			
G0G1	Between Groups	37,278	3	12,426	,807	,525
	Within Groups	123,206	8	15,401		
	Total	160,484	11			
S	Between Groups	12,081	3	4,027	2,100	,179
	Within Groups	15,338	8	1,917		
	Total	27,419	11			
G2M	Between Groups	2,042	3	,681	,797	,529
	Within Groups	6,835	8	,854		
	Total	8,877	11			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
SubG1	,00	,50	1,76000	2,73922	,915	-7,0119	10,5319
		,74	-4,19333	2,73922	,464	-12,9653	4,5786
		1,00	-4,87333	2,73922	,348	-13,6453	3,8986
	,50	,00	-1,76000	2,73922	,915	-10,5319	7,0119
		,74	-5,95333	2,73922	,210	-14,7253	2,8186
		1,00	-6,63333	2,73922	,150	-15,4053	2,1386
	,74	,00	4,19333	2,73922	,464	-4,5786	12,9653
		,50	5,95333	2,73922	,210	-2,8186	14,7253
		1,00	-,68000	2,73922	,994	-9,4519	8,0919
	1,00	,00	4,87333	2,73922	,348	-3,8986	13,6453
		,50	6,63333	2,73922	,150	-2,1386	15,4053
		,74	,68000	2,73922	,994	-8,0919	9,4519
G0G1	,00	,50	-1,94667	3,20424	,927	-12,2078	8,3144
		,74	2,79667	3,20424	,819	-7,4644	13,0578
		1,00	1,47000	3,20424	,966	-8,7911	11,7311
	,50	,00	1,94667	3,20424	,927	-8,3144	12,2078
		,74	4,74333	3,20424	,490	-5,5178	15,0044
		1,00	3,41667	3,20424	,718	-6,8444	13,6778
	,74	,00	-2,79667	3,20424	,819	-13,0578	7,4644
		,50	-4,74333	3,20424	,490	-15,0044	5,5178
		1,00	-1,32667	3,20424	,975	-11,5878	8,9344
	1,00	,00	-1,47000	3,20424	,966	-11,7311	8,7911
		,50	-3,41667	3,20424	,718	-13,6778	6,8444
		,74	1,32667	3,20424	,975	-8,9344	11,5878
S	,00	,50	,06000	1,13057	1,000	-3,5605	3,6805
		,74	,57000	1,13057	,956	-3,0505	4,1905
		1,00	2,47000	1,13057	,207	-1,1505	6,0905
	,50	,00	-,06000	1,13057	1,000	-3,6805	3,5605
		,74	,51000	1,13057	,968	-3,1105	4,1305
		1,00	2,41000	1,13057	,222	-1,2105	6,0305
	,74	,00	-,57000	1,13057	,956	-4,1905	3,0505
		,50	-,51000	1,13057	,968	-4,1305	3,1105
		1,00	1,90000	1,13057	,392	-1,7205	5,5205
	1,00	,00	-2,47000	1,13057	,207	-6,0905	1,1505
		,50	-2,41000	1,13057	,222	-6,0305	1,2105
		,74	-1,90000	1,13057	,392	-5,5205	1,7205
G2M	,00	,50	,12667	,75469	,998	-2,2901	2,5435
		,74	,82667	,75469	,702	-1,5901	3,2435
		1,00	,93333	,75469	,623	-1,4835	3,3501
	,50	,00	-,12667	,75469	,998	-2,5435	2,2901
		,74	,70000	,75469	,792	-1,7168	3,1168
		1,00	,80667	,75469	,717	-1,6101	3,2235
	,74	,00	-,82667	,75469	,702	-3,2435	1,5901
		,50	-,70000	,75469	,792	-3,1168	1,7168
		1,00	,10667	,75469	,999	-2,3101	2,5235
	1,00	,00	-,93333	,75469	,623	-3,3501	1,4835
		,50	-,80667	,75469	,717	-3,2235	1,6101
		,74	-,10667	,75469	,999	-2,5235	2,3101

Homogeneous Subsets

SubG1

Tukey HSD^a

Grupo	N	Subset for alpha = .05
		1
,50	3	8,8833
,00	3	10,6433
,74	3	14,8367
1,00	3	15,5167
Sig.		,150

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

G0G1

Tukey HSD^a

Grupo	N	Subset for alpha = .05
		1
,74	3	80,2667
1,00	3	81,5933
,00	3	83,0633
,50	3	85,0100
Sig.		,490

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

S

Tukey HSD^a

Grupo	N	Subset for alpha = .05
		1
1,00	3	2,0067
,74	3	3,9067
,50	3	4,4167
,00	3	4,4767
Sig.		,207

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

G2M

Tukey HSD^a

Grupo	N	Subset for alpha = .05
		1
1,00	3	,8833
,74	3	,9900
,50	3	1,6900
,00	3	1,8167
Sig.		,623

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.