

Francisca Sousa Pereira

## EGCG do chá verde – um agente natural contra o cancro colorretal e cancro da mama

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Biomédica, especialidade em Instrumentação Biomédica e Biomateriais, orientada pela Doutora Ana Cristina Santos e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Francisca Sousa Pereira

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

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

*Thesis submitted to the University of Coimbra in compliance with the requirements for  
the degree of Master in Biomedical Engineering*

Supervisores:

Doutora Ana Cristina Aguiar Santos (Instituto Biofísica - IBILI - FMUC)

Prof<sup>a</sup> Doutora Bárbara Oliveiros (LBIM - IBILI - FMUC)

Coimbra, 2017

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:





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

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





# Resumo

Reconhecem-se desde a antiguidade os benefícios para a saúde do chá verde, particularmente a proteção contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancro. Os polifenóis do chá verde, fortes antioxidantes, dos quais a epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o mais abundante, são considerados os componentes ativos responsáveis pelas suas propriedades anticancerígenas. Estudos têm sugerido potencial atividade clínica para altas doses de chá verde, na prevenção do cancro colorretal e da mama. No entanto, existem discrepâncias entre investigações, sendo necessário realizar mais estudos controlados e com tratamento estatístico adequado.

Neste contexto, este estudo pretende quantificar o EGCG presente em diferentes marcas registadas e marcas brancas de chá verde e de diferentes extratos, disponíveis no mercado nacional e internacional. Pretende-se também analisar a possível citotoxicidade do EGCG e a sua eficácia na inibição do crescimento de duas linhas celulares cancerígenas humanas: cólon (WiDr) e mama (MCF7).

Recentemente foram realizados estudos, *in vitro* e *in vivo*, com a linha celular WiDr e fármacos utilizados no tratamento do cancro colorretal, utilizando um extrato enriquecido em EGCG. Pretendeu realizar-se um estudo *in vitro* semelhante com a linha celular MCF7 e fármacos instituídos para o tratamento do cancro da mama, utilizando outros extratos enriquecidos em EGCG. Este projeto pretende contribuir também para a avaliação de chás verdes e extratos de chá verde numa possível potenciação do efeito de fármacos usados na sua terapêutica.

Pretendeu obter-se mais informação através de um modelo animal *in vivo* utilizando ratos RNU, com xenoinxertos de WiDr e MCF7, aos quais se administrou um outro extrato enriquecido em EGCG. Em suma, pretende tentar-se esclarecer melhor em que medida o EGCG poderá ser utilizado como um agente natural coadjuvante na luta contra o cancro colorretal e cancro da mama.

**Palavras-chave:** chá verde, EGCG, cancro colorretal, cancro da mama, WiDr, MCF7,



# *Abstract*

Green tea has since long been praised for its health benefits, ranging from protection against heart disease, neurodegenerative disease and cancer. Green tea polyphenols, strong antioxidants, of which (–)-epigallocatechin-3-galate (EGCG) is the most abundant, are considered to be the active components responsible for its cancer prevention properties. Studies have been suggesting that high doses of green tea could have potential effects in colorectal and breast cancer prevention. However, there is much discrepancy between results of different studies, and, thus, further testing is required with controlled and adequate statistical analysis.

In this context, this study intends to quantify the EGCG present in different trademark and non-labeled brands and different green tea extracts available in the national and international market. It is also intended to analyze the cytotoxicity of EGCG and its efficacy in the inhibition of two different human cell lines: colon (WiDr) and breast (MCF7).

Recently, studies have been performed, *in vitro* and *in vivo*, with the WiDr cell line using an EGCG-enriched extract as well as drugs for its chemotherapy. This project intends to contribute to the evaluation of several green teas and green teas extracts (enriched in EGCG) in a possible synergetic effect with chemotherapeutic drugs.

It was intended to obtain more information using RNU rats as an *in vivo* model, with xenografts of WiDr and MCF7 cell lines. Another EGCG-enriched extract has been administered to the animals. Overall, it is intended to enlighten the extent to which EGCG can be used as a natural adjuvant agent in the fight against colorectal cancer and breast cancer.

**Key words:** green tea, EGCG, colorectal cancer, breast cancer, WiDr, MCF7



# Agradecimentos

Na realização deste projeto, tive a enorme sorte de ser dirigido por uma equipa de orientadores extremamente acessível e competente, que sempre me propôs objetivos interessantes, reais e planeados, mantendo-se ativamente pronta para me ajudar a realizá-los.



*“The greater the difficulty,  
the greater the glory.”*

Marcus Tullius Cícero (106-43 a.C.)



# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice</b> .....	<b>ix</b>
<b>Glossário</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Capítulo 1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Contextualização e Motivação .....	1
1.2. Objetivos.....	3
1.3. Estrutura do Projeto para a obtenção do grau de Mestre .....	4
<b>Capítulo 2 Fundamentos Teóricos</b> .....	<b>6</b>
2.1. Cancro Colorretal.....	6
2.1.1. Fatores de risco e desenvolvimento do cancro .....	9
2.1.2. Tratamentos .....	10
2.1.3. Linha celular WiDr.....	10
2.2. Cancro da Mama.....	11
2.2.1. Fatores de risco e desenvolvimento do cancro .....	14
2.2.2. Tratamentos .....	14
2.2.3. Linha celular MCF7.....	16
2.3. Moléculas naturais e inibidores de tumores .....	16
2.4. Chá.....	18
2.5. EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato .....	20
2.6. Fármacos utilizados em quimioterapia .....	22
2.7. Modelo animal .....	24
2.8. Técnica histológica .....	28
<b>Capítulo 3 Materiais e Métodos</b> .....	<b>29</b>
3.1. Linhas celulares utilizadas .....	29
3.1.1. Diferenciação entre EMEM e DMEM.....	29
3.2. Obtenção das células pretendidas .....	30
3.2.1. Cultura celular .....	31

3.2.2.	Contagem celular .....	33
3.3.	Utilização de chá verde e extratos de chá verde .....	35
3.3.1.	Determinação das concentrações de EGCG no chá .....	35
3.3.2.	Estudos <i>in vitro</i> usando chás verdes .....	39
3.3.3.	Soluções de extratos de chá verde enriquecidos em EGCG .....	39
3.4.	Estudos <i>in vitro</i> .....	40
3.4.1.	Objetivos gerais .....	40
3.4.2.	Estudo da linha celular WiDr .....	41
3.4.3.	Estudo da linha celular MCF7 .....	43
3.4.4.	Estudo com chás e extratos de chá verde.....	46
3.4.5.	Teste do MTT .....	47
3.5.	Estudos <i>in vivo</i> .....	49
3.6.	Estudos histológicos .....	54
3.7.	Análise estatística .....	57
<b>Capítulo 4</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>59</b>
4.1.	Concentração de EGCG no chá e extratos de chá verde.....	59
4.2.	Estudos <i>in vitro</i> .....	65
4.2.1.	Número de células .....	65
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>68</b>

# Glossário

<b>5-FU</b>	5-fluouracilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BRCA1</b>	<i>Breast cancer 1 gene, early onset</i>
<b>BRCA2</b>	<i>Breast cancer 2 gene</i>
<b>CapOx</b>	Capecitabina e oxaliplatina
<b>CK5</b>	Citoceratina 5 (do inglês <i>cytokeratin 5</i> )
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EGCG</b>	Epigalocatequina-3-galato
<b>EGFR</b>	Recetor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMEM</b>	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
<b>ER</b>	Recetor de estrogénio (do inglês <i>estrogen receptor</i> )
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FOLFIRI</b>	5-fluouracilo, leucovorina e irinotecano
<b>FOLFOX</b>	5-fluouracilo, leucovorina e oxaliplatina
<b>FOLFOXIRI</b>	5-fluouracilo, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano
<b>GTEE</b>	<i>Green Tea EGCG Extreme™ (ProHealth)</i>
<b>GTE</b>	<i>Green Tea Extract (MyProtein®)</i>
<b>HER2</b>	Recetor Tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>HNPCC</b>	Cancro colorretal hereditário sem polipose
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i> )
<b>IFL</b>	5-fluouracilo e leucovorina
<b>IGFBP</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina, do inglês <i>insulin-like growth factor-binding protein</i>
<b>MGTE</b>	<i>Mega Green Tea Extract (MyProtein®)</i>

<b>MOCF</b>	Microscópio Ótico de Contraste de Fase
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
<b>NEAA</b>	Aminoácidos não essenciais, do inglês <i>non essential amino acids</i>
<b>Pen/Strep</b>	Penicilina/estreptomicina
<b>PR</b>	Recetor de progesterona (do inglês <i>progesterone receptor</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
<b>TNM</b>	Tumor-nódulo-metástase



# Índice de Figuras

Figura 1 – Tendência observada na incidência do cancro do cólon em Portugal, e previsões até 2020 (retirado de [15]).....	7
Figura 2 – Tendência observada na incidência do cancro da mama em Portugal e previsões até 2020 (retirado de [15]).....	12
Figura 3 – Os fitoquímicos podem exercer efeitos preventivos ou terapêuticos bloqueando passos chave na iniciação e promoção do tumor, revertendo o seu o estado pré-maligno ou inibindo a sua progressão (adaptado de [43]). .....	18
Figura 4 – Estrutura química da (–)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) (retirado de [47]).....	20
Figura 5 – Esquema representativo da anatomia do animal utilizado nos testes in vivo: o rato (adaptado de [72]). .....	28
Figura 6 – [A] Câmara de Neubauer (adaptado de [78]); [B] Vista lateral da lamela colocada sobre a câmara de Neubauer, cobrindo a área central onde está a gelha de contagem, que serve para conter a amostra entre o fundo da câmara e a própria lamela (adaptado de [77]); [C] esquema de quadrantes utilizado na contagem de células (adaptado de [78])......	34
Figura 7 – Representação esquemática de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (adaptado de [80]).....	36
Figura 8 – Representação esquemática do protocolo de preparação de uma solução de chá verde a estudar, usando uma saqueta de chá verde. ....	37
Figura 9 – Exemplo de um esquema de uma caixa de cultura celular de 48 poços utilizada no estudo do EGCG presente nos diferentes tipos de chá verde estudados. ....	47
Figura 10 – Esquema da redução do MTT a <i>formazan</i> . Esta reação apenas pode ocorrer quando as enzimas redutoras estão ativas. Esta conversão é, portanto, usada para quantificar a viabilidade celular (adaptado de [84]). .....	48
Figura 11 – Fotografias tiradas com o microscópio ótico de contraste de fase a um poço de uma caixa de cultura de 48 poços, após 3 reaplicações de uma solução de GTE pó: [A] antes da adição de MTT e [B] após adição de MTT. É possível notar que em [B] apenas algumas células estão coradas, mostrando que a viabilidade celular diminuiu significativamente com a adição do composto em causa. ....	49
Figura 12 – Inoculação subcutânea de células tumorais na região lateral da coxa direita de um rato RNU. ....	52
Figura 13 – Injeção subcutânea, num rato fêmea RNU, da suspensão de estradiol em óleo de sésamo, para estimulação do crescimento da linha celular MCF7, inoculada 7 dias antes. ....	52
Figura 14 – Dissecção de um rato na zona de desenvolvimento do tumor para colher amostras para análise histológica: [A] restos de gordura fibrosa no local de desenvolvimento do tumor, [B] cassete de fixação utilizada com amostra de rim. ....	54
Figura 15 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do EGCG-Puro.....	60
Figura 16 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Cem Porcento. ....	60
Figura 17 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Gorreana. ....	61

Figura 18 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Lipton. ....	61
Figura 19 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Lipton, mostrando a representação por picos. ....	61
Figura 20 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Pingo Doce. ....	62
Figura 21 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Solúvel. ....	62
Figura 22 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Taylors. ....	62
Figura 23 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Tetley Mel e Limão. ....	63
Figura 24 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Twinings. ....	63
Figura 25 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do extrato de pó GTE ( <i>Green Tea Extract</i> ). ....	64
Figura 26 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do extrato de cápsula MGTE ( <i>Mega Green Tea Extract</i> ). ....	64
Figura 27 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do extrato de cápsula GTEE ( <i>Green Tea EGCG Extreme</i> ). ....	64
Figura 28 – Gráficos relativos à linha celular WiDr mostrando todos os tempos de colagem e os respectivos dias de seguimento, em relação ao número de células utilizado e <b>[A]</b> ao desvio dos valores de MTT e <b>[B]</b> ao desvio dos valores de MTT Standardizado (StdMTT). ....	66
Figura 29 – Gráficos relativos à linha celular MCF7 mostrando todos os tempos de colagem e os respectivos dias de seguimento, em relação ao número de células utilizado e <b>[A]</b> ao desvio dos valores de MTT e <b>[B]</b> ao desvio dos valores de MTT Standardizado (StdMTT). ....	67



# Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sistema tumor-nódulo-metástase (TNM) para o cancro colorretal, definido pelo <i>American Joint Committee on Cancer</i> [17].	8
Tabela 2 – Sistema tumor-nódulo-metástase (TNM) para o cancro da mama, definido pelo <i>American Joint Committee on Cancer</i> [24].	13
Tabela 3 – Classificação dos diferentes subtipos moleculares do cancro da mama [28], [29].	14
Tabela 4 – Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG infundida durante a preparação do chá verde de diferentes marcas.	60
Tabela 5 – Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG infundida nos extratos de chá verde em cápsula.	63
Tabela 6 – Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG infundida no extratos de chá verde em pó. ...	63
Tabela 7 – Tempo que a linha celular WiDr demora a aderir à superfície dos poços nas caixas de cultura e o respetivo tempo de seguimento de incubação numa incubadora apropriada.	65
Tabela 8 – Tempo que a linha celular MCF7 demora a aderir à superfície dos poços nas caixas de cultura e o respetivo tempo de seguimento de incubação numa incubadora apropriada.	67



# Capítulo 1

## Introdução

Este capítulo irá descrever, de forma geral, todo o trabalho que se desenvolveu. Inicialmente, irá ser abordada a problemática oncológica que afeta a população mundial em geral, referindo dados estatísticos atualizados nesta área, e que originou e impulsionou este estudo. Para além disso, é apresentado o plano de trabalhos, os métodos utilizados e a estrutura do Projeto para obtenção do grau de Mestre, juntamente com um breve resumo do que é abordado em cada capítulo. Por fim, é referida a contribuição científica deste estudo.

### 1.1. Contextualização e Motivação

A oncologia é um ramo da ciência médica ligado à prevenção, diagnóstico e tratamento de tumores, quer benignos quer malignos. Cada uma das células do corpo humano tem um sistema bem regulado que controla o seu crescimento, maturidade, reprodução e, eventualmente, a morte [1]. As designações tumor e cancro são muitas vezes usadas como sinónimo, o que não é correto. Um neoplasma corresponde a um crescimento anormal de células, mais rápido do que o típico, e que continuará a ocorrer se não for tratado. O termo tumor é comumente usado, embora não seja específico, ao referir um neoplasma. Na realidade, um tumor significa apenas uma massa. Um neoplasma pode ser benigno (geralmente curável) ou maligno (cancerígeno). Um “tumor” benigno geralmente é localizado e não atinge outras zonas do organismo. A maioria reage bem ao tratamento, no entanto, se não tratados, podem crescer bastante e provocar consequências graves por isso mesmo. Por vezes, mimetizam “tumores” malignos o que leva a efetuar terapêutica. Um “tumor” maligno ou cancro invade os tecidos circundantes, quebrando as barreiras de defesa e muitas vezes oferece resistência ao tratamento, pode originar metástases e, por vezes, tem recorrência mesmo após a remoção cirúrgica. Ao invadirem e danificarem os tecidos e órgãos circundantes, imediatamente a seguir às

doenças cardíacas, os tumores malignos são responsáveis pela segunda maior causa de morte a nível mundial e nacional [2].

Responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015 a nível mundial, quase uma em cada seis mortes é devida ao cancro [3]. A Europa, com apenas um oitavo da população mundial, tem cerca de um quarto dos casos de cancro globais, com cerca de 3,7 milhões de novos doentes por ano, sendo os mais mortais o do pulmão, colorretal, mama e próstata [4], [5]. Já em Portugal, em 2014, cerca de um quarto das mortes que ocorreram foram devidas a esta patologia e, em 16 600 mortes de homens devido ao cancro, 15,3% foram devido ao cancro colorretal, enquanto em 10 600 mortes de mulheres, 16,9% foram devidas ao cancro da mama e 16,4% devido ao cancro colorretal [6].

Comparando com o ano de 2008, regista-se um aumento de 11% de incidência e 8% de mortes associadas a esta patologia, evidenciando uma tendência de crescente impacto a nível mundial. Com base no envelhecimento da população, prevê-se para a próxima década um aumento de 13,7% para a União Europeia e de 12,6% para Portugal de novos casos de cancro [7]. Com base nestes dados estatísticos avassaladores, torna-se primordial a descoberta de compostos que não só possam prevenir esta patologia, como tratá-la mais eficazmente.

Por sua vez, existem referências de que, já desde a pré-história, as plantas medicinais eram utilizadas por praticamente todas as civilizações do globo terrestre. Hoje em dia, existem cerca de 500 mil espécies de plantas no planeta e cerca de 7 000 são ou já foram estudadas para aplicações médicas. Para além disso, 25% das prescrições de fármacos atualmente contêm compostos isolados de plantas [8].

Neste estudo pretende-se relacionar uma das patologias que mais mortes causa, com uma das 7000 plantas já estudadas, e que é responsável pela infusão mais consumida no mundo, depois da água: o chá. Um exemplo prático dos benefícios deste composto é que, há cerca de 10 anos, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a venda de sinecatequinas (Veregen, Bradley/MediGene, AG, D82152 Planegg/Martinsried, Alemanha), um fármaco botânico utilizado no tratamento de problemas genitais. As sinecatequinas são um extrato de água de folhas de chá verde da planta *Camellia sinensis*, e foi o primeiro extrato de ervas a ser aprovado como medicamento para terapia clínica. O novo fármaco, produzido a partir de chá verde, representa agora uma alternativa real à terapia convencional, e demonstra como é que ensaios clínicos bem-sucedidos relativamente às

terapêuticas do chá verde e das suas catequinas podem levar a importantes formulações benéficas para a saúde [9].

## 1.2. Objetivos

Reconhecem-se desde a antiguidade os benefícios para a saúde do chá verde, particularmente a proteção contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancro [10]. Os polifenóis do chá verde, fortes antioxidantes, dos quais a epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o mais abundante, são considerados os componentes ativos responsáveis pelas suas propriedades anticancerígenas [11]. Estudos têm sugerido potencial atividade clínica para altas doses de chá verde, na prevenção do cancro colorretal e da mama [12], [13]. No entanto, existem discrepâncias entre investigações, sendo necessário realizar mais estudos controlados e com tratamento estatístico adequado.

Neste contexto, este estudo pretende quantificar o EGCG presente em diferentes marcas registadas e marcas brancas de chá verde e de diferentes extratos, disponíveis no mercado nacional e internacional. Pretende-se também analisar a possível citotoxicidade do EGCG e a sua eficácia na inibição do crescimento de duas linhas celulares cancerígenas humanas: cólon (WiDr) e mama (MCF7).

Recentemente foram realizados estudos, *in vitro* e *in vivo*, com a linha celular WiDr e fármacos utilizados no tratamento do cancro colorretal, utilizando um extrato enriquecido em EGCG. Pretendeu realizar-se um estudo *in vitro* semelhante com a linha celular MCF7 e fármacos instituídos para o tratamento do cancro da mama, utilizando outros extratos enriquecidos em EGCG. Este projeto pretende contribuir também para a avaliação de chás verdes e extratos de chá verde numa possível potenciação do efeito de fármacos usados na sua terapêutica.

Pretendeu obter-se mais informação através de um modelo animal *in vivo* utilizando ratos RNU, com xenoinxertos de WiDr e MCF7, aos quais se administrou um outro extrato enriquecido em EGCG. Em suma, pretende tentar-se esclarecer melhor em que medida o EGCG poderá ser utilizado como um agente natural coadjuvante na luta contra o cancro colorretal e cancro da mama.

## 1.3. Estrutura do Projeto para a obtenção do grau de Mestre

### Capítulo 1: Introdução

Neste capítulo aborda-se a contextualização do trabalho, assim como os seus objetivos. Pretende explicar-se de forma resumida como está dividido este projeto e quais são os principais temas abordados.

### Capítulo 2: Fundamentos Teóricos

Neste capítulo abordam-se inicialmente dados estatísticos sobre o cancro colorretal e o cancro da mama, temas que impulsionaram este estudo.

Explica-se, também, cada estadió dos referidos cancros, a taxa de sobrevivência aos 5 anos e vários esquemas terapêuticos disponíveis para cada um deles. As linhas celulares escolhidas para realizar este estudo (WiDr – cancro colorretal e MCF7 – cancro da mama) foram descritas, bem como os fatores que levaram à sua escolha.

Como foi pretendido associar esta patologia oncológica a moléculas naturais e inibidores tumorais, foi abordada esta inter-relação e os possíveis benefícios da utilização de plantas naturais ou seus derivados. Foi analisada, em particular, a planta *Camellia sinensis* que dá origem ao chá verde, a segunda infusão mais consumida no mundo a seguir à água, e a (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), o composto polifenólico que é considerado o principal responsável pelos benefícios para a saúde a que o consumo de chá verde está associado.

Foram descritos os agentes/esquemas quimioterapêuticos para o cancro colorretal e da mama selecionados para este estudo e abordada uma possível relação sinérgica com a EGCG que se tentou colocar em evidência.

Por fim, foi descrito o modelo animal escolhido para induzir tumores não ortotópicos de cancro colorretal e da mama, usando as referidas linhas celulares, sujeitos à administração de um extrato de chá verde rico em EGCG.

### Capítulo 3: Materiais e Métodos

Neste capítulo são abordados os procedimentos com as linhas celulares utilizadas, assim como a sua obtenção, para realizar experiências reprodutíveis de forma consistente. São descritos os chás verdes e extratos de chá verde estudados, motivo desta escolha e o seu modo de preparação, bem como a técnica analítica envolvida na determinação da concentração de EGCG presente em cada um deles: a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

O projeto tem duas partes distintas, mas convergentes: os testes realizados *in vitro* e ensaios *in vivo*. No primeiro caso são delineados os procedimentos do estudo tanto com a linha celular WiDr como com a linha MCF7, que são avaliadas e analisadas independentemente. Também se descreve o método de estudo da citotoxicidade celular induzida, explicando em que consiste o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Nos estudos *in vivo* apresentam-se as condições do modelo animal utilizado para a inoculação subcutânea das células tumorais, desenvolvimento dos referidos tumores não ortotópicos e a sua ocisão, obedecendo e respeitando as normas dos estudos animais. Por fim, descreve-se de que forma se avaliaram, por histologia convencional, as amostras de vários órgãos e do tumor/local do tumor colhidas dos referidos animais.

### Capítulo 4: Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com todos os métodos utilizados neste projeto: HPLC, testes *in vitro* e *in vivo* e seu tratamento estatístico, usando o programa SPSS e, posteriormente, feita uma análise crítica integrada dos mesmos.

### Capítulo 5: Conclusões

Neste capítulo são mencionadas as principais conclusões retiradas deste estudo e de que forma podem contribuir para estudos posteriores e para o avanço do conhecimento na área. Para além disso, são ainda sugeridas propostas para trabalho futuro.

# Capítulo 2

## Fundamentos Teóricos

Este capítulo irá abordar os conceitos utilizados para fundamentar a elaboração do presente estudo. Inicialmente, irão ser referidas características do cancro colorretal e do cancro da mama, assim como o motivo da escolha das linhas tumorais selecionadas. Posteriormente, irá ser apresentada uma solução a partir de um composto natural que poderia ser utilizada em associação com os fármacos e as técnicas terapêuticas atuais, possibilitando uma diminuição das doses dos tratamentos mais extremos, com o objetivo de tentar ajudar a melhorar a qualidade de vida destes doentes e das suas famílias.

### 2.1. Cancro Colorretal

O cancro colorretal é a segunda causa de morte do foro oncológico mais frequente em Portugal, sendo responsável por mais de 10 mortes por dia (Figura 1) [6]. Desde 1970 que a incidência desta patologia quase duplicou, o que sugere que o estilo de vida da população tem tido um grande impacto no seu desenvolvimento. A maioria dos casos tem origens espontâneas (60-85%), mas o cancro colorretal também pode ter características heredo-familiares: polipose adenomatosa familiar (1%) e cancro colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) (5%) [14].

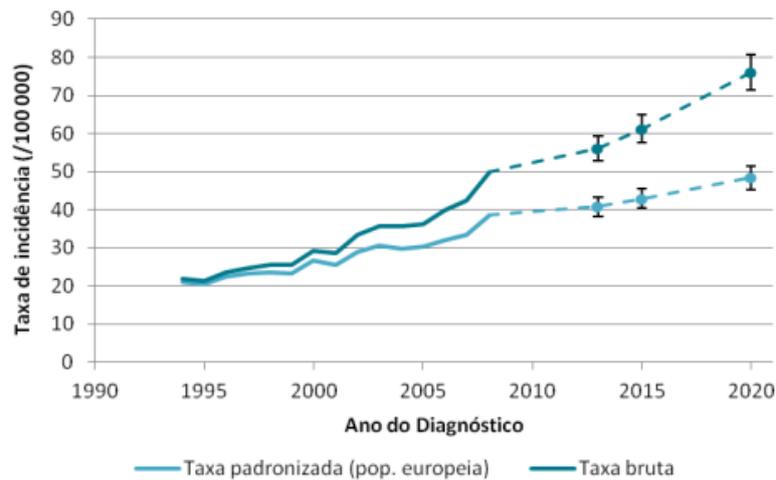


Figura 1 – Tendência observada na incidência do cancro do cólon em Portugal, e previsões até 2020 (retirado de [15]).

O estado patológico representa o fator de prognóstico mais importante para os doentes. O sistema tumor-nódulo-metástase (TNM), definido pelo *American Joint Committee on Cancer*, é o mais frequente de estadiamento e tem em conta a profundidade da invasão na parede do intestino, a extensão da invasão de gânglios linfáticos locais e a presença da doença em locais mais distantes (Tabela 1). A profundidade da invasão tumoral define o estadio T, a patologia de gânglios linfáticos envolvidos define as categorias dos três N [N0 (sem gânglios linfáticos), N1 (1-3 gânglios linfáticos) e N2 (+3 gânglios linfáticos)] e a propagação do tumor para além do colorretal e dos gânglios linfáticos próximos define o estadio M, onde M1 indica a presença de metástases tumorais em locais mais distantes [16].

Tabela 1 – Sistema tumor-nódulo-metástase (TNM) para o cancro colorretal, definido pelo *American Joint Committee on Cancer* [17].

<b>Estadio I</b>	Estadio IA	T1-T2, N0, M0	o tumor cresceu através da mucosa muscular até à submucosa (T1) ou <i>muscularis propria</i> (T2) e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
	Estadio IIA	T3, N0, M0	o tumor cresceu nas camadas mais externas do cólon ou do reto, mas não as ultrapassou (T3) e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
<b>Estadio II</b>	Estadio IIB	T4a, N0, M0	o tumor cresceu através da parede do cólon ou do reto, mas não noutros tecidos ou órgãos próximos (T4a) e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
	Estadio IIC	T4b, N0, M0	o tumor cresceu através da parede do cólon ou do reto até outros tecidos ou órgãos mais próximos (T4b) e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
<b>Estadio III</b>	Estadio IIIA	T1-T2, N1, M0	o tumor cresceu através da mucosa até à submucosa (T1) ou <i>muscularis propria</i> (T2), já se disseminou para 1-3 gânglios linfáticos próximos (N1), mas não para locais distantes (M0)
		T1, N2a, M0	o tumor cresceu através da mucosa até à submucosa (T1), já se disseminou para 4-6 gânglios linfáticos (N2), mas não para locais distantes (M0)
	Estadio IIIB	T3-T4a, N1, M0	o tumor cresceu até às camadas mais externas do cólon ou do reto (T3) ou através do peritoneu visceral (T4a), já se disseminou para 1-3 gânglios linfáticos próximos (N1), mas não para locais distantes (M0)
		T2-T3, N2a, M0	o tumor cresceu até à <i>muscularis propria</i> (T2) ou camadas mais externas do cólon ou do reto (T3), já se disseminou para 4-6 gânglios linfáticos próximos (N2a), mas não para locais distantes (M0)
		T1-T2, N2b, M0	o tumor cresceu através da mucosa até à submucosa (T1) ou <i>muscularis propria</i> (T2), já se disseminou para mais de 7 gânglios linfáticos próximos (N2b), mas não para locais distantes (M0)
	Estadio IIIC	T4a, N2a, M0	o tumor cresceu através da parede do cólon ou do reto, incluindo o peritoneu visceral (T4a), já se disseminou para 4-6 gânglios linfáticos próximos (N2a), mas não para locais distantes (M0)
		T3-T4a, N2b, M0	o tumor cresceu nas camadas mais externas do cólon ou do reto (T3) ou através do peritónio visceral (T4a), já se disseminou para mais de 7 gânglios linfáticos próximos (N2b), mas não para locais distantes (M0)
		T4a, N1-N2, M0	o tumor cresceu através da parede do cólon ou do reto e noutros tecidos ou órgãos próximos (T4b), já se disseminou para pelo menos 1 gânglio linfático ou área de gordura próxima (N1-N2), mas não para locais distantes (M0)
<b>Estadio IV</b>	Estadio IVA	T, N, M1a	o tumor pode ter qualquer tamanho (T) ou ter-se disseminado para gânglios linfáticos próximos (N), mas já invadiu 1 órgão distante e gânglios linfáticos distantes do cólon e do reto (M1a)
	Estadio IVB	T, N, M1b	o tumor pode ter qualquer tamanho (T) ou ter-se disseminado para gânglios linfáticos próximos (N), mas já se disseminou para mais de 1 órgão distante e gânglios linfáticos distantes do cólon e do reto ou partes distintas do peritoneu (M2)

O fígado é o órgão mais frequente na disseminação inicial da doença, mas também é comum encontrar metástases noutros órgãos ou estruturas ganglionares. À medida que os estadios aumentam, a taxa de sobrevivência aos 5 anos diminui drasticamente: o estadio

I tem uma taxa de sobrevivência de cerca de 90%; o estadio II entre 70% a 85%; o estadio III entre 25% a 80%; e o estadio IV de menos de 10% [16].

### 2.1.1. Fatores de risco e desenvolvimento do cancro

A maioria dos casos de cancro colorretal tem origens espontâneas e muitas destas são condicionadas por fatores ambientais e culturais. A obesidade ou excesso de peso no ocidente europeu está associado à ingestão de baixos níveis de cálcio e vitamina D, que estimula a produção de ácidos biliares, resultando na irritação contínua da mucosa e, conseqüentemente, de constantes processos de reparação e proliferação, considerados promotores de alterações genéticas. Para além disso, novos estudos apontam para um consumo excessivo de carnes vermelhas processadas que, pelo processo de cozedura, pode levar à exposição de substâncias químicas cancerígenas, onde a relação sinérgica com o vírus bovino potencialmente oncológico pode contaminar a preparação da carne e desencadear infeções latentes no trato colorretal [14].

Foram descritas três origens como a base para a transformação maligna no cólon: instabilidade de cromosomas, instabilidade de microssatélites e metilação. Há mais de uma década foram descritas informações iniciais sobre a base molecular da neoplasia colorretal, proporcionando um paradigma da caracterização molecular para o desenvolvimento do cancro noutros órgãos. A transformação maligna do epitélio colorretal ocorre frequentemente como um processo multifocal, que causa danos cumulativos a vários genes entre as gerações celulares [18].

Através da instabilidade de microssatélites (associada a piores prognósticos) e da perda de heterozigotia no cromosoma 18q (frequente em cerca de 50% dos doentes com cancro do cólon) o desenvolvimento do tumor pode ser confirmado, sendo estes os dois melhores marcadores de prognóstico. A instabilidade de microssatélites provém de mutações do ADN que levam a erros na sua replicação e, conseqüentemente, a mudanças nas suas sequências repetidas. Esta característica está presente na maioria dos tumores de doentes com cancro do cólon hereditário sem polipose, mas também é encontrado em 15% a 20% dos doentes com cancro do cólon de origem espontânea. Todavia, embora estes fatores influenciem a probabilidade de recorrência do tumor após a primeira ressecção, não está comprovado que sejam potenciais marcadores preditivos para a instituição de regimes quimioterapêuticos específicos [16].

## 2.1.2. Tratamentos

O tratamento do cancro colorretal baseia-se principalmente no estadió em este se encontra, embora também existam outros fatores importantes a considerar. No estadió I, se o pólipó for removido completamente durante a colonoscopia, sem células cancerígenas nas margens da amostra removida, pode não ser necessário nenhum outro tratamento. Caso contrário, é recomendável uma abordagem cirúrgica. No estadió II, adicionalmente à cirurgia, pode ser recomendada quimioterapia adjuvante se o cancro tiver elevado risco de recorrência. Todavia, nem todos os clínicos concordam como o uso de quimioterapia neste estadió, pois os efeitos secundários podem não justificar a utilização de alguns fármacos. Ainda assim, caso seja utilizada, as opções mais frequentes são o 5-fluouracilo (5-FU) e leucovorina (ácido folínico), oxaliplatina ou capecitabina. No estadió III a cirurgia é seguida de quimioterapia adjuvante, onde os regimes FOLFOX (5-FU, leucovorina e oxaliplatina) ou CapOx (capecitabina e oxaliplatina) são utilizados na maioria das vezes, embora alguns doentes possam seguir o regime IFL (5-FU e leucovorina) ou capecitabina em monoterapia, com base na idade e condicionantes de saúde. A radioterapia, seguida de quimioterapia, também é opção para doentes que não tenham uma situação geral que permita efetuar cirurgia, com o objetivo de diminuir o estadió e o tamanho do tumor, embora neste tratamento exista maior toxicidade aguda e tardia. No estadió IV é pouco provável que a cirurgia cure estes tipos de cancro. É instituída quimioterapia neoadjuvante, onde os regimes FOLFOX (5-FU, leucovorina e oxaliplatina), FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecano), CapOx (capecitabina e oxaliplatina) ou FOLFOXIRI (5-FU, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano) são utilizados na maioria das vezes. Para tratamentos específicos, os doentes no estadió III ou IV podem ainda ter a adição de outros fármacos monoclonais, tais como o bevacizumab ou o cetuximab. No início do século XXI começaram a desenvolver-se terapêuticas biológicas para o tratamento do cancro, mas ainda existe muita margem de progressos nesta área [16], [19].

## 2.1.3. Linha celular WiDr

A linha celular WiDr (ATCC® CCL-218TM) foi originalmente descrita, em 1971, como um adenocarcinoma do cólon, estabelecida a partir de uma mulher de 78 anos de idade. Todavia, através do método de identificação da impressão digital do ácido

desoxirribonucleico (ADN), foi demonstrado que esta linha celular era derivada da linha celular HT-29, estabelecida em 1964, como um adenocarcinoma do cólon [20], [21]. As células são negativas para o Antígeno do Cólon 3, mas positivas para queratina por coloração com imunoperoxidase e expressam o antígeno p53. O crescimento das células WiDr é inibido pelo fator de necrose tumoral alfa (os inibidores de di-hidrofolato-redutase são altamente citotóxicos para estas células) [21].

A linha celular WiDr é derivada de um adenocarcinoma do cólon humano. Produz antígeno carcinoembrionário (CEA) em cultura, sendo que a quantidade deste aumenta de forma quase logarítmica ao longo do período de cultura, tornando-o assim num marcador bioquímico útil. Para além disso, tem um curto tempo de duplicação comparativamente a outras linhas celulares de cancro do cólon, cerca de 15 horas, e uma eficiência de revestimento de 51%, estando demonstrado que se propaga facilmente em cultura com características aderentes. Esta linha celular, quando inoculada em animais, desenvolve tumores histologicamente confirmados com cerca de 100% de eficiência, tendo sido testada em, pelo menos, 4 diferentes espécies. É uma linha celular bem caracterizada e utilizada, diversas vezes, em estudos anti tumorais e de carcinogénese tanto *in vitro* como *in vivo* [22].

## 2.2. Cancro da Mama

O cancro da mama é a primeira causa de morte oncológica mais frequente na mulher, com elevada prevalência e incidência em Portugal, sendo responsável por cerca de 4 a 5 mortes por dia (Figura 2) [6]. A sua incidência é três vezes mais comum nos países desenvolvidos do que nos países em desenvolvimento. A maioria dos casos tem origens espontâneas, mas o cancro da mama também pode ser hereditário: mutação do gene BRCA1 (do inglês *breast cancer 1, early onset*) (cromosoma 17q) e do gene BRCA2 (do inglês *breast cancer 2*) (cromosoma 13q) (5-10%) [23].

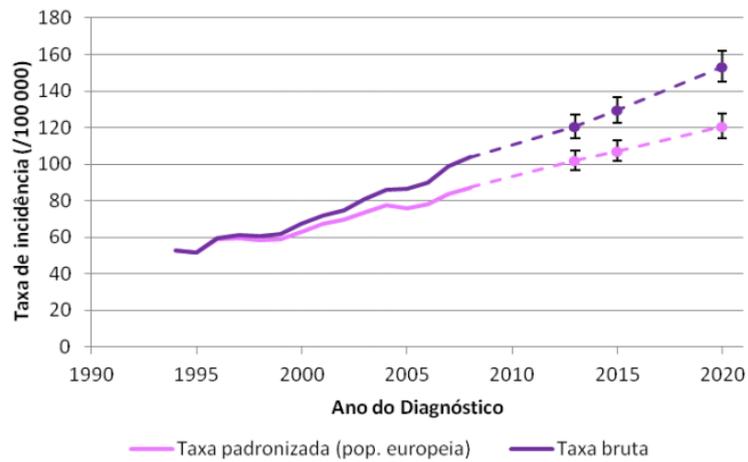


Figura 2 – Tendência observada na incidência do cancro da mama em Portugal e previsões até 2020 (retirado de [15]).

O estado patológico representa o fator de prognóstico mais importante para os doentes, sendo o sistema tumor-nódulo-metástase (TNM), definido pela *American Joint Committee on Cancer*, o mais frequente de estadiamento.

Tabela 2 – Sistema tumor-nódulo-metástase (TNM) para o cancro da mama, definido pelo *American Joint Committee on Cancer* [24].

<b>Estadio I</b>	Estadio IA	T1, N0, M0	o tumor tem no máximo 2 cm (T1) e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
	Estadio IB	T0-T1, N1mi, M0	o tumor tem no máximo 2 cm (T1), são encontradas micrometástases em 1-3 gânglios linfáticos axilares com o tamanho máximo de 2 mm (N1mi), mas não se disseminou para locais distantes (M0)
<b>Estadio II</b>	Estadio IIA	T0-T1, N1, M0	o tumor tem no máximo 2 cm (T0-T1), já se disseminou para 1-3 gânglios linfáticos axilares maiores que 2 mm de diâmetro (N1a), <b>ou</b> gânglios linfáticos mamários internos (N1b), <b>ou</b> ambos (N1c); mas não para locais distantes (M0)
		T2, N0, M0	o tumor tem mais de 2 cm mas menos de 5 cm (T2) e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
	Estadio IIB	T2, N1, M0	o tumor tem mais de 2 cm mas menos de 5 cm (T2), já se disseminou para 1-3 gânglios linfáticos axilares ou mamários internos (N1), mas não para locais distantes (M0)
<b>Estadio III</b>	Estadio IIIA	T3, N0, M0	o tumor tem mais de 5 cm mas não cresceu na parede torácica nem na pele (T3), e não se disseminou para gânglios linfáticos (N0) nem locais distantes (M0)
		T0-T2, N2, M0	o tumor tem no máximo 5 cm (T0-T2), já se disseminou para 4-9 gânglios linfáticos axilares ou mamários internos (N2), mas não para locais distantes (M0)
	Estadio IIIB	T3, N1-N2, M0	o tumor tem mais de 5 cm mas não cresceu na parede torácica nem na pele (T3), já se disseminou para 1-9 gânglios linfáticos axilares ou mamários internos (N1-N2), mas não para locais distantes (M0)
	Estadio IIIC	T4, N0-N2, M0	o tumor cresceu na parede torácica ou na pele (T4), já se disseminou para no máximo 9 gânglios linfáticos (N0-N2), mas não para locais distantes (M0)
<b>Estadio IV</b>	Estadio IIIC	T, N3, M0	o tumor pode ter qualquer tamanho (T), já se disseminou para mais de 10 gânglios linfáticos axilares <b>ou</b> por baixo da clavícula, <b>ou</b> mais de 4 axilares e mamários internos (N3), mas não para locais distantes (M0)
		T, N, M1	o tumor pode ter qualquer tamanho (T), ou se disseminou para gânglios linfáticos próximos (N), mas já se disseminou para órgãos e gânglios linfáticos distantes da mama (M1)

As estruturas ósseas, fígado, cérebro ou pulmões são os locais mais frequentes da disseminação inicial da doença, mas também é comum encontrar metástases noutros locais [24]. À medida que os estadios aumentam, a taxa de sobrevivência aos 5 anos diminui: o estadio I tem uma taxa de sobrevivência de perto de 100%; o estadio II cerca de 93%, o estadio III cerca de 72% e o estadio IV de cerca de 22% [25].

## 2.2.1. Fatores de risco e desenvolvimento do cancro

A maioria dos casos de cancro da mama tem origens espontâneas e a sua grande incidência nas mulheres deve-se principalmente ao aparecimento precoce da menstruação, às gravidezes mais tardias e ao início mais tardio da menopausa, bem como à utilização de terapia hormonal nesta fase, e à obesidade e consumo de álcool. Para além disso, o rastreio preventivo e a mamografia também levaram a um aumento da sua deteção [26].

O cancro da mama não é uma doença única, mas uma patologia heterogénea com inúmeros subtipos associados a diferentes resultados clínicos e moleculares, onde a iniciação e progressão do tumor são predominantemente impulsionadas por alterações genéticas e mudanças ambientais e epigenéticas [27]. Podemos verificar quais os principais subtipos moleculares de cancro da mama na Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação dos diferentes subtipos moleculares do cancro da mama<sup>1</sup> [28], [29].

<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Imunomarcação</b>	<b>Características</b>
Luminal A	ER <sup>+</sup> ; PR <sup>+</sup> ; HER2 <sup>-</sup>	Ki-67 baixo; geralmente responsivo a quimioterapia
Luminal B	ER <sup>+</sup> ; PR <sup>+</sup> ; HER2 <sup>+</sup>	Ki-67 elevado; variável à quimioterapia; HER <sup>+</sup> responsivo a trastuzumab
Basalóide	ER <sup>-</sup> ; PR <sup>-</sup> ; HER2 <sup>-</sup>	Ki-67 elevado; CK5 <sup>+</sup> e/ou EGFR <sup>+</sup> ; Ki67 elevado; geralmente responsivo a quimioterapia
Triplo-negativo não basalóide	ER <sup>-</sup> ; PR <sup>-</sup> ; HER2 <sup>-</sup>	Ki-67 baixo; CK5 <sup>-</sup> e EGFR <sup>-</sup> ; variável à quimioterapia;
Híper-expressão de HER2	ER <sup>-</sup> ; PR <sup>-</sup> ; HER2 <sup>+</sup>	Ki-67 elevado; HER <sup>+</sup> responsivo a trastuzumab

## 2.2.2. Tratamentos

Mulheres com cancro da mama não metastático (M0) são habitualmente sujeitas a cirurgia e radioterapia como principais tratamentos, geralmente associados a quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante (depois ou antes da cirurgia, respetivamente). O tratamento para cancros de estadio IV, que já se espalharam para além da mama e dos

---

<sup>1</sup>CK5 (citoceratina 5, do inglês *cytokeratin 5*); EGFR (recetor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico, do inglês *epidermal growth factor receptor*); ER (recetor de estrogénio, do inglês *estrogen receptor*); HER2 (recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*); PR (recetor de progesterona, do inglês *progesterone receptor*).

gânglios linfáticos próximos (M1), geralmente consiste em terapia sistêmica [30]. Para além disso, cada subtipo de cancro da mama também tem um prognóstico e terapêutica eletiva mais frequente. O subtipo Luminal A, que representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas da mama, e o Luminal B, cerca de 10-20%, podem ser tratados com quimioterapia seguida de hormonoterapia. Para a forma associada à hiper-expressão de HER2, que tem um mau prognóstico e um grande poder metastático, é utilizada quimioterapia seguida de terapia com trastuzumab. O subtipo basalóide e o subtipo triponegativo não basalóide, que representam 15% dos casos, são biologicamente os mais agressivos e os que têm pior prognóstico; é utilizada quimioterapia, com a escolha de fármacos a variar de acordo com as características individuais [29]. Todavia, seja qual for o subtipo do cancro da mama, a escolha do agente endócrino deve se ter sempre em consideração o estado de menopausa, comorbilidades, terapêutica adjuvante prévia e perfil de segurança dos fármacos [31].

Para quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, os fármacos antineoplásicos mais frequentemente utilizados na prática clínica são antraciclina, como a doxorrubicina e a epirrubicina, e antimicrotúbulos da classe dos taxanos, como o paclitaxel e o docetaxel, que são os mais eficazes quer para a doença metastizada quer para a doença precoce [32]. Com o uso crescente destas classes de fármacos em contexto de tratamento adjuvante ou neoadjuvante, a seleção da quimioterapia para a doença em estadio IV é cada vez mais influenciada por questões de toxicidade cumulativa e resistência [33]. A cardiotoxicidade cumulativa (antraciclina) e a neuropatia (antimicrotúbulos) podem limitar a duração da terapêutica ou impedir o retratamento com estas classes de fármacos, se utilizadas previamente [32]. Caso não tenha sido realizada terapêutica prévia, em contexto adjuvante, com antraciclina ou antimicrotúbulos, estas são opções de primeira linha [34]. Caso contrário, existem outras alternativas, nomeadamente antimetabolitos, como a capecitabina (dada a sua eficácia e facilidade de administração por via oral) [35], o 5-FU, agentes alquilantes, como a ciclofosfamida; e outros como o tamoxifeno. O tamoxifeno, para além de funcionar como antagonista da ação do estrogénio ao nível da mama, apresenta efeitos agonistas parciais noutros locais, como o osso ou o útero. O efeito agonista é prejudicial ao aumentar o risco de cancro do endométrio ou eventos tromboembólicos, mas é vantajoso na prevenção da desmineralização óssea [36]–[38].

### 2.2.3. Linha celular MCF7

A linha celular MCF7 (ATCC® HTB-22TM) foi obtida, em 1970, de uma mulher de 69 anos de idade com cancro da mama metastático. Das duas mastectomias que realizou, a primeira revelou que o tecido removido era benigno, mas a segunda intervenção demonstrou um adenocarcinoma maligno num derrame pleural, de onde foram removidas estas células. As recorrências locais foram controladas durante 3 anos com radioterapia e hormonoterapia, tendo a doença sido controlada durante o triplo do tempo do que seria esperado [39]. A linha MCF7 tem várias características do epitélio mamário diferenciado e a capacidade de formar cúpulas. O crescimento destas células aderentes é inibido pelo fator de necrose tumoral alfa e a secreção de IGFBP (fator de crescimento semelhante à insulina, do inglês *insulin-like growth factor-binding protein*) pode ser modulada por tratamento com antiestrogénios [40].

A linha celular MCF7 é das linhas celulares de cancro da mama mais utilizadas no mundo. É utilizada para diversos estudos oncológicos *in vitro*, pois contém várias características ideais específicas do epitélio mamário diferenciado como, por exemplo, a capacidade de processar estrogénio, na forma de estradiol, através de recetores citoplasmáticos de estrogénio. Esta capacidade faz com que esta linha celular seja um recetor de estrogénio positivo. Para além disso, a linha celular MCF7 é também um recetor de progesterona positivo e HER2 negativo, sendo por isso um exemplo de uma linha celular de subtipo molecular Luminal A. Embora seja fácil de metastizar, a linha celular MCF7 tem um crescimento lento, com um tempo de duplicação de 38 horas, formando estruturas muito coesas que demonstram uma forte adesão entre as células. Esta linha celular já foi também utilizada em diversos estudos *in vivo* em diferentes espécies, tendo sido demonstrado que apenas forma tumores na presença de estrogénio [28], [41].

## 2.3. Moléculas naturais e inibidores de tumores

As formas de tratamento oncológico têm vindo a evoluir sendo cada vez mais eficazes, eletivas e com menos efeitos secundários. Todavia, uma solução abrangente e totalmente confiável para esta doença está ainda muito longe de ser atingida. A quimioterapia pode, muitas vezes, aliviar temporariamente os sintomas, aumentar a esperança de vida e minimizar os fatores de risco do cancro, mas é importante ter-se em

consideração todos os seus efeitos secundários antes de se decidir iniciar ou continuar a sua aplicação. Neste contexto, nos últimos anos, múltiplos esforços têm sido feitos para identificar e sintetizar novas possíveis moléculas e fármacos anticancerígenos. Presentemente, encontram-se em fase de ensaio clínico terapêuticas biológicas muito promissoras, com elevada eficácia e segurança, mas o custo de um tratamento personalizado para cada fenótipo será um obstáculo determinante. A disponibilidade de novas moléculas inovadoras para aplicação terapêutica, novos protocolos com os fármacos de utilização atual e a modificação dos existentes é um alvo interessante de pesquisa para a terapia contra o cancro [42].

Para além disso, com o aumento do conhecimento relativamente ao desenvolvimento de tumores, foi possível perceber que a carcinogénese é um processo de múltiplas etapas compostas por sistemas altamente variáveis, caracterizada pela progressão de diferentes alterações moleculares que, em última instância, transformam uma célula normal numa cancerígena através de divisão celular descontrolada. Assim, a prevenção e tratamento do cancro passa muito pela identificação de agentes que atuem particularmente em estadios iniciais da transformação celular (Figura 3). Nesta categoria incluem-se alguns produtos naturais, cuja ampla gama de efeitos celulares é capaz de afetar tanto a iniciação como a promoção e a propagação do tumor, fornecendo constantemente modelos para fins profiláticos e terapêuticos de cancros e outras doenças crónicas [43].

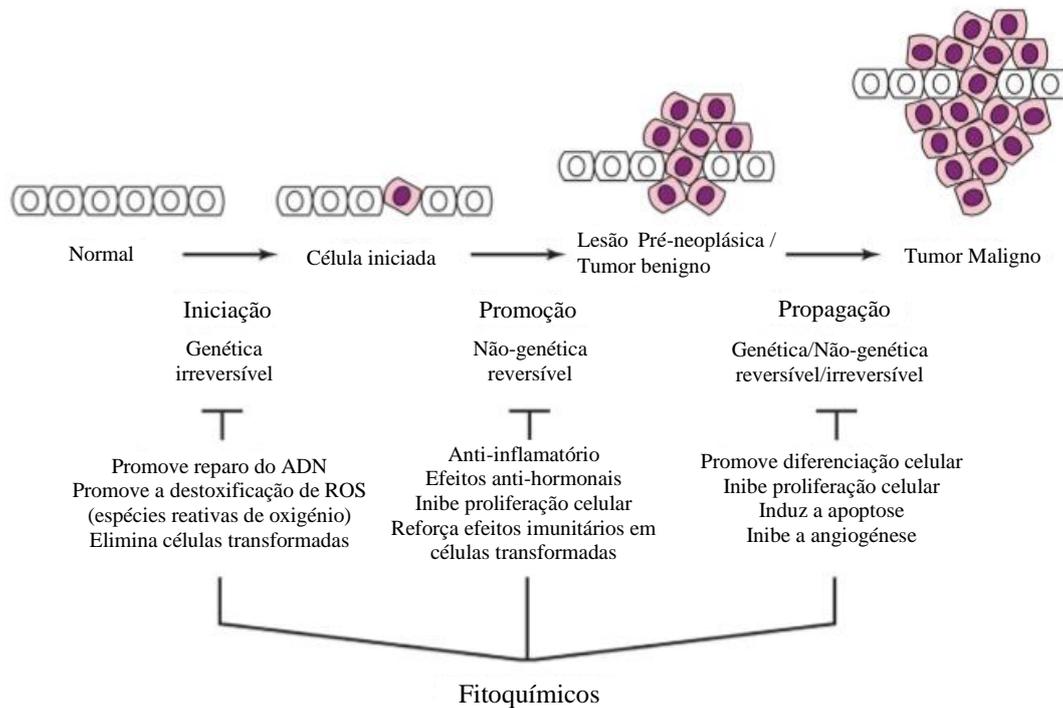


Figura 3 – Os fitoquímicos podem exercer efeitos preventivos ou terapêuticos bloqueando passos chave na iniciação e promoção do tumor, revertendo o seu o estado pré-maligno ou inibindo a sua progressão (adaptado de [43]).

Estudos recentes sobre compostos inibidores de tumores de origem natural demonstraram que alguns, nomeadamente os polifenóis presentes no chá, a bebida, depois da água, mais consumida no mundo, são capazes de atuar através de várias vias para induzir a morte seletiva de células cancerígenas. Podem, também, prevenir a oncogénese através da inibição ou atraso da progressão do tumor ou até através da promoção da diferenciação celular e influenciar os supressores de tumores por inibição das vias de proliferação celular [42], [43].

## 2.4. Chá

O chá é uma infusão produzida a partir de folhas de *Camellia sinensis*, da família botânica *Theaceae*. Embora a sua composição possa variar, o chá é composto por um conjunto de polifenóis, alcalóides, minerais e outros compostos orgânicos voláteis [43]. Todavia, os diferentes processamentos das folhas resultam em diferentes tipos de chá: o chá preto, o chá verde e o chá *oolong* [44].

O processamento do chá verde é feito através da cozedura de folhas frescas de chá imediatamente após a colheita, a temperaturas elevadas, para evitar a oxidação de polifenóis. Por outro lado, no processamento do chá preto, as folhas de chá são secas e esmagadas após a colheita para que ocorra fermentação e oxidação, fazendo com que alguns polifenóis presentes no chá, principalmente catequinas e galocatequinas, se convertam noutros polifenóis, principalmente teaflavinas e arubiginas. Por fim, no processamento do chá *oolong* as folhas de chá são apenas parcialmente oxidadas. Globalmente, cerca de 78% da produção de chá é chá preto (consumido maioritariamente nos Estados Unidos, Europa e Oeste Asiático), 20% são chá verde (consumido maioritariamente no Japão e China) e 2% são chá *oolong* (consumido maioritariamente em Taiwan e Sudeste da China) [44].

O consumo de chá no mundo não é uniforme. Este não só varia de país para país, como existem países que praticamente não consomem chá. Neste contexto, embora já existam estudos, realizados nos últimos 20 anos, sobre os benefícios dos componentes do chá na prevenção de algumas doenças, incluindo vários tipos de cancro, muitos destes foram realizados em populações restritas onde o consumo de chá verde é elevado. Não tendo sido consideradas variáveis como a genética individual, o estilo de vida e o estadió do cancro na conclusão destes estudos, muitos podem não ser aplicáveis noutras sociedades [45].

Os principais constituintes das folhas de chá são os polifenóis, fortes antioxidantes, considerados os componentes ativos presente no chá responsáveis pelas propriedades preventivas no cancro. De entre os polifenóis, os mais abundantes são os flavonóides, frequentemente conhecidos como catequinas [45]. Numa chávena de chá com 2,5 g de folhas de chá e 250 ml de água, o chá verde contém cerca de 30-40% de catequinas e 3-6% de cafeína, enquanto o chá preto, preparado de forma semelhante, contém 3-10% de catequinas, 3-10% de cafeína, 2-7% de teaflavinas e 15-20% de arubiginas [44].

As principais catequinas presentes são: (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC) e (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG), sendo que esta última é a mais abundante no chá e, particularmente, no chá verde. Uma chávena de chá verde contém cerca de 100-200 mg de EGCG, que representa cerca de 65% do conteúdo total de todas as catequinas. Este composto polifenólico é considerado o principal responsável pelos benefícios para a saúde a que o consumo de chá verde está

associado. Nestes incluem-se efeitos antioxidantes, proteção contra problemas cardíacos, perda de peso, proteção da pele contra os danos causados por radiação ionizante, entre outros. Uma vez que tem uma atividade antioxidante, ao reagir com espécies reativas de oxigênio, previne a excitabilidade de histonas em células normais, pelo que atualmente é considerado um nutracêutico e onco-preventivo [10], [45], [46].

## 2.5. EGCG: (–)-epigallocatequina-3-galato

O composto EGCG demonstrou regular vários alvos moleculares de diversas doenças, ser capaz de induzir alterações metabólicas preventivas do cancro, tais como otimizar a apoptose, suprimir a proliferação celular e inibir a angiogénese, o que originou vários estudos pré-clínicos bem-sucedidos. No entanto, apenas um número limitado de estudos foi capaz de expor o impacto distinto que o EGCG pode ter na prevenção e tratamento do cancro. Muitas dessas falhas foram atribuídas à biodisponibilidade variável do EGCG, à distribuição de compostos do chá verde e à efetiva redução de risco apreciável, que pode demorar vários anos a ser detetado em grandes estudos populacionais [43].

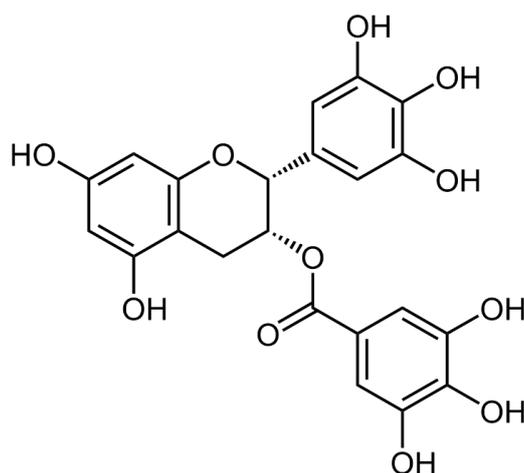


Figura 4 – Estrutura química da (–)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) (retirado de [47]).

Estudos farmacocinéticos realizados em seres humanos indicam que as concentrações fisiologicamente relevantes de EGCG no soro são elevadas e que, dada a

sua baixa biodisponibilidade, é improvável que ocorram essas concentrações de EGCG na corrente sanguínea de indivíduos que ingerem apenas duas ou três chávenas de 200 mg de chá verde por dia. No entanto, estudos epidemiológicos continuam a sugerir que existem benefícios para a saúde associados com o consumo de chá verde. Estas informações são reforçadas por estudos em animais que indicam que o consumo de chá verde e de produtos de chá verde com elevados níveis de EGCG e de outras catequinas pode ter um efeito significativo na prevenção de tumores, doenças cardiovasculares e outras condições médicas. Esta aparente discrepância originou novas pesquisas, sugerindo-se que o efeito do EGCG pode ser sinérgico quando combinado com outras catequinas. Para além disso, foi também sugerido que o EGCG pode ser ativado metabolicamente para formar compostos bioativos mais potentes e efetivos. Outros autores, por outro lado, defendem que o EGCG pode ser acumulado nos tecidos ao longo do tempo para, assim, atingir concentrações celulares muito superiores às que foram determinadas em amostras de soro [46].

Ao serem levantadas estas questões, foram realizados estudos clínicos para examinar o perfil farmacocinético do EGCG após administrações orais em humanos saudáveis. Foi analisada a segurança, tolerabilidade e propriedades farmacológicas do EGCG, administrando doses únicas a variar entre 50 e 1 600 mg. Foi demonstrado que apenas em doses orais de mais de 1 g de EGCG as concentrações máximas plasmáticas observadas são superiores a 1  $\mu\text{M}$ , atingidas entre 1,3-2,2 horas após a toma, com uma variação entre os 130 e 3 392 ng/ml. Foi, também, avaliado o efeito da administração de uma ou duas doses diárias de EGCG durante quatro semanas. Conforme observado no estudo anterior, a ingestão de 400 e 800 mg de EGCG estabeleceu as concentrações máximas de EGCG no soro. Contudo, foi demonstrado um aumento da biodisponibilidade de EGCG após a administração crónica de 800 mg. Verificou-se, igualmente, que a administração diária de EGCG apenas produziu pequenos efeitos colaterais gastrointestinais. Foi concluído que, de facto, o EGCG atinge, através do consumo de chá verde ou de suplementos dietéticos ricos em EGCG, concentrações dentro de valores capazes de inibir de forma potente e específica alguns alvos moleculares importantes [46].

Após estas análises, o interesse pelo EGCG intensificou-se e começaram a ser realizados estudos com linhas celulares de cancro colorretal, mama, próstata, pulmão, entre outras [44]. Mais recentemente, em 2014, estudos com a linha celular MCF7 demonstraram que não só havia mudanças significativas no crescimento destas células -

diminuiu bastante e resultou na sua morte após tratamento com EGCG utilizando os níveis fisiológicos necessários – como as células epiteliais não malignas correspondentes, MCF10A, não foram afetadas. Dadas estas conclusões, foram iniciados estudos com linhas celulares com os fármacos usados na quimioterapia correspondente, de forma a tentar analisar se o efeito do EGCG seria potenciado [12].

## 2.6. Fármacos utilizados em quimioterapia

Ao longo dos últimos anos, a terapêutica oncológica tem evoluído drasticamente, embora um dos aspetos mais importantes, para reduzir a taxa de mortalidade associada ao cancro, seja um diagnóstico precoce. O desenvolvimento e a implementação de tratamentos antineoplásicos intensivos melhoraram substancialmente o prognóstico dos doentes oncológicos. No entanto, apesar do benefício clínico inquestionável deste tipo de terapia, não se deve subestimar o seu perfil de segurança. De facto, devido aos seus mecanismos de ação, muitos destes fármacos podem causar efeitos nefastos, nomeadamente no sistema cardiovascular [37].

Todos os fármacos utilizados na quimioterapia têm efeitos secundários e riscos associados e não podem ser administrados em todos os doentes. É preciso ter em conta os tratamentos efetuados anteriormente e os fármacos utilizados, o uso de determinadas medicações não oncológicas que poderiam interferir no tratamento, a idade do doente e algumas características individuais como problemas de saúde e condições particulares ou temporárias. Para além disso, têm também instruções de aplicação e de segurança que são importantes a ter em consideração aquando a sua administração. O tratamento médico varia conforme a idade, o grau de diferenciação das células (atividade proliferativa), a invasão ganglionar, a intensidade de marcação dos recetores e a extensão da invasão vascular. As respetivas dosagens, por seu lado, também variam conforme o fármaco, o tempo de tratamento, a idade e o estado geral do doente [37], [48].

Consequentemente, no início do século XXI começaram a desenvolver-se terapêuticas biológicas para o tratamento do cancro, sendo o EGCG um dos compostos naturais estudados, tanto individualmente no crescimento de células cancerígenas e células saudáveis, como juntamente com fármacos terapêuticos. O EGCG, em combinação com fármacos quimioterapêuticos, atua sinergeticamente para aumentar os seus efeitos curativos e diminuir a sua toxicidade. Como as modalidades terapêuticas

disponíveis para o cancro, nomeadamente colorretal e da mama, incluem a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de associar estas duas vertentes: quimioterapia e terapêuticas biológicas [13], [49], [50].

Ao ter sido demonstrado o efeito do EGCG em células malignas, começou a estudar-se o efeito deste composto nos fármacos utilizados para as diversas linhas celulares tumorais, incluindo novos agentes biológicos antiangiogénicos para o cancro colorretal e agentes antineoplásicos, como agentes alquilantes, agentes antimetabólitos, agentes antimicrotúbulos e antraciclinas, para o cancro da mama [32], [34].

Os agentes alquilantes são compostos capazes de substituir um átomo de hidrogénio por um radical alquilo. Estes ligam-se ao ADN de modo a impedir a separação dos seus dois filamentos da dupla hélice, algo indispensável na sua replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo não específico. Os principais fármacos desta classe incluem a ciclofosfamida [51], [52] (administração diária por via oral de 1-5 mg/kg) [53], [54].

Os agentes antimetabólitos afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do ADN e do RNA. Deste modo, impedem a multiplicação e o funcionamento normais da célula. A inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas, à produção de ácido timidílico e a outras etapas da síntese de ácidos nucleicos. Os antimetabólicos são particularmente ativos contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular (fase S). A duração da vida das células tumorais suscetíveis determina a média de destruição destas células, as quais são impedidas de entrar em mitose pela ação dos agentes metabólicos que atuam na fase S. Os principais fármacos desta classe incluem a capecitabina (administração semanal por via oral de cerca de 1000 mg/m<sup>2</sup> a cada três semanas) e o 5-FU (administração semanal por via intravenosa de cerca de 450-600 mg/m<sup>2</sup>) [51], [52], [55]–[58].

Os agentes antimicrotúbulos ligam-se à proteína tubulina e inibem a quebra dos microtúbulos, uma rede dinâmica de heterodímeros de tubulina envolvidas em muitos processos celulares importantes, especialmente na constituição das fibras necessárias para a divisão celular. Ao interromper esta dinâmica, a divisão celular é inibida e é prevenido o crescimento de células cancerígenas. Os principais fármacos desta classe incluem os taxanos como o paclitaxel (administração a cada 3 semanas por via intravenosa de cerca de 175 mg/m<sup>2</sup>) e o docetaxel (administração a cada 3 semanas por via intravenosa de

cerca de 60-100 mg/m<sup>2</sup>), e os alcaloides de vinca como a vimblastina (administração semanal por via intravenosa de cerca de 4-6 mg/m<sup>2</sup>) [59]–[62].

Os antibióticos naturais são um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o ADN e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. As antraciclinas representam uma importante classe de antibióticos antitumorais. Evidências sugerem que as antraciclinas apresentam três mecanismos de ação. Um é a formação de ligações com os grupos fosfolipídeos (carregados negativamente) da membrana celular, alterando a sua fluidez, assim como o transporte de iões. Também promoverim a formação do radical livre do oxigénio e da semiquinona, através de um processo redutor enzimático. Um outro modo de ação é a formação de ligações interfilamentares com o ADN, que leva ao bloqueio da síntese do ADN e RNA e a diminuição da atividade da topoisomerase II, promovendo a rutura dos filamentos da macromolécula (ADN). Os principais fármacos desta classe incluem a doxorrubicina (administrado por via intravenosa cerca de 60-75 mg/m<sup>2</sup> a cada 3 semanas) e a epirrubicina (administrado por via intravenosa cerca de 100-120 mg/m<sup>2</sup> a cada 3 ou 4 semanas) [52], [59], [63], [64].

Em 2015, um estudo com a linha celular MCF7 indicou um aumento de 20% na morte celular em células resistentes à doxorrubicina, que foram primeiro tratadas com EGCG e só depois com este fármaco, comparando com células que foram tratadas com doxorrubicina sem pré-tratamento com EGCG [65].

Existem inúmeras linhas de investigação nesta área que se espera possam vir a ter aplicabilidade clínica de forma racional e cientificamente sustentada na evidência. Existem muitos fármacos e linhas celulares para estudar, sendo necessário analisar uma possível sinergia entre os agentes quimioterapêuticos e o EGCG presente em diferentes marcas de chá verde e extratos de chá verde existentes no mercado, nomeadamente Europeu, cuja população e hábitos de consumo do chá verde diferem bastante dos de outros continentes [13], [44].

## 2.7. Modelo animal

Os modelos animais são bastante utilizados em muitas áreas de pesquisa biológica. Como se trata de modelos experimentais, torna-se importante referir, neste contexto, o

significado de doença animal, que é aquela cujos mecanismos patológicos são suficientemente parecidos com os de uma doença humana podendo, assim, servir como modelo de estudo [66].

Um modelo animal deve permitir a avaliação de fenómenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, para que possam, obrigatoriamente, ser comparados com os fenómenos humanos em estudo. Antigamente, os animais de laboratório eram utilizados como simples “instrumentos de trabalho” nas investigações do diagnóstico de diferentes estudos, sem se implementarem quaisquer regras ou normas de qualidade sanitária, genética e ética. Com o avanço da ciência foram criadas exigências que levaram à criação de uma autêntica especialidade: a “Ciência em animais de laboratório”. Atualmente é exigido que esses animais reúnam condições ideais, sejam mantidos em ambientes controlados e se restrinja o número de animais por experiência ao mínimo possível. Tendo em conta que são “reagentes biológicos”, os resultados dos estudos e investigações experimentais podem ser afetados pelas condições de cada espécie utilizada sendo necessário, por isso, obedecer a critérios que estão legislados. Neste sentido, quanto maior for a uniformidade dos animais em relação às variáveis ambientais, genéticas e experimentais, menor será o número de indivíduos da amostra necessária para a pesquisa ser validada [66]. Deve-se, portanto, nos ensaios *in vivo*, seguir o princípio dos 3 R’s: tentar-se sempre fazer uma Reposição de modelos alternativos de estudo, de forma a Reduzir o número de animais utilizados ao mínimo possível e Refinar os testes utilizados para que os animais não tenham de sofrer ou entrar em estado de *stress* [67].

Desde há muitos anos que o rato é o modelo animal mais utilizado em estudos *in vivo*, uma vez que não só tem características anatómicas e fisiológicas idênticas às do ser humano e partilha uma grande parte do código genético, como é fácil de manipular, tem uma alta taxa de reprodução e uma manutenção relativamente económica. Devido ao seu tamanho reduzido, podem ser mantidos em espaços pequenos (gaiolas), em instalações apropriadas, certificadas e aprovadas pelos serviços de controlo do Bem-Estar animal<sup>2</sup> [66].

Uma estirpe de ratos bastante utilizada em laboratório é a RNU (*Rowett Nude*) quando é necessário usar um modelo de maior porte do que o ratinho Balb/c *nude*. O rato

---

<sup>2</sup>Decreto-Lei n° 113/2014, de 7 de Agosto, Divisão do Bem-Estar Animal, da Direção Geral de Veterinária, do Ministério da Agricultura, Florestas, Desenvolvimento Rural e Pescas [86].

*nude* foi criado em laboratório entre 1979 e 1980 no *National Institute of Health* nos EUA através de uma série de acasalamentos, tendo o gene *Rowett nude* sido adicionado e cruzado em 8 estirpes: BN/SsN, MR/N, BUF/N, WN/N, ACI/N, WKY/N, M520/N e F344/N. Dadas as características de imunodeficiência que a estirpe possui, é utilizado para estudos imunológicos, infecciosos e oncológicos. Esta estirpe tem ausência de timo ou apresenta timo rudimentar, sendo assim portador de deficiência de imunidade celular mediada por linfócitos T, tolerando a integração de heterotransplantes. A imunodeficiência torna estes animais muito vulneráveis, podendo ser um fator limitante para alguns tipos de pesquisas. Em condições normais, os ratos RNU *nude* têm um tempo médio de vida de 9 meses, mas se forem mantidos em condições livres de patógenos as infecções ocorrem com muito menos frequência e o seu tempo médio de vida pode aumentar até 2 anos [66], [68], [69].

A anatomia deste modelo animal é simples, podendo representar-se esquematicamente como se mostra na Figura 5. Este rato possui:

- um par de membros superiores e um par de membros posteriores mais desenvolvidos já que é saltador, com 4 dedos em cada pata e almofadas tácteis muito sensíveis entre os dedos;
- pode ter ou não pigmentação da pele (preta ou branca) sendo muitas vezes preta nos olhos, cabeça e porção dorsal; durante a sua vida pode ter períodos em que possui pelos curtos e finos que podem crescer em manchas em pequenas quantidades;
- a cabeça alongada, pois o cérebro dos ratos é mais oblongo, tendo o lobo olfativo e a zona auditiva bastante desenvolvidos, embora em comprimentos de onda diferentes dos humanos. Os pelos dos bigodes são vibráteis e extremamente importantes para a pesquisa de alimentos, defesa e cálculo de dimensões;
- aplasia congênita do timo, que faz com que tenha uma deficiência no sistema imunológico, já que não possui linfócitos T, embora tenha linfócitos B e células NK (*natural killer*);
- o sistema respiratório, com a devida redução à escala, idêntico aos dos humanos, com a traqueia igualmente numa posição anterior ao esófago;

- as cavidades torácica e abdominal também separadas pelo diafragma; o coração tem uma estrutura e funcionamento semelhante ao da espécie humana e encontra-se na cavidade torácica, mais do lado esquerdo;
- o peritoneu, na cavidade abdominal, que envolve e protege a face anterior dos órgãos abdominais;
- o sistema digestivo, com uma proporcionalidade de dimensão reduzida, idêntico ao do humano. As glândulas salivares, principalmente as sub-mandibulares, são bastante desenvolvidas, pois são roedores. O fígado situa-se também no hipocôndrio direito, logo abaixo do diafragma, no entanto, é bastante maior e com lobos mais achatados, recobrando todo o estômago e porção superior do intestino delgado. A principal diferença é que nestes animais não existe vesícula biliar e o pâncreas não é um órgão estruturado. Todavia, existem ilhéus de Langerhans dispersos na gordura que envolve a grande curvatura do estômago e pregas do duodeno;
- o baço mais alongado e delgado que o dos humanos;
- o sistema renal semelhante em tudo ao do humano, salvo nas dimensões;
- as fêmeas são férteis, embora tenham um pequeno desenvolvimento das glândulas mamárias. Em centros certificados, durante o período de criação, o acasalamento é efetuado em ninhada monógama e não consanguínea, com um período de gestação de 21 a 23 dias, nascendo normalmente 10 a 12 crias por ninhada, que são mantidas numa incubadora [69]–[72].

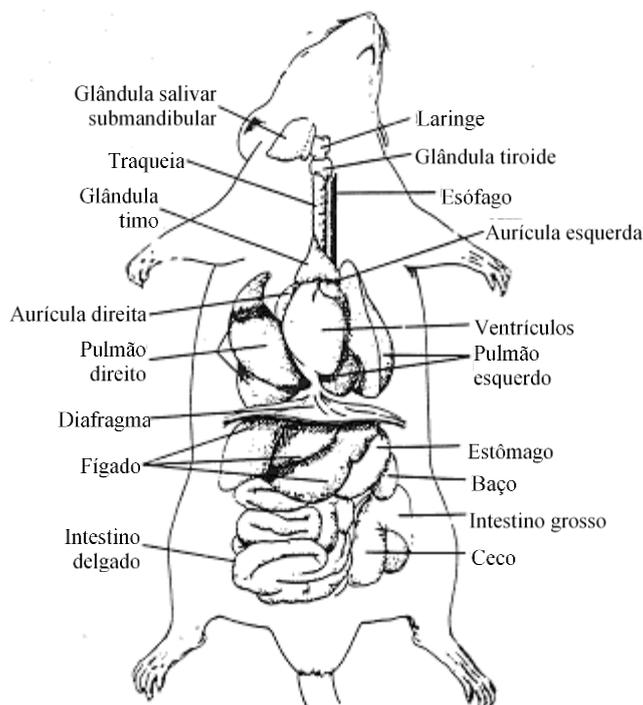


Figura 5 – Esquema representativo da anatomia do animal utilizado nos testes in vivo: o rato (adaptado de [72]).

## 2.8. Técnica histológica

A técnica histológica é o conjunto de operações que tem como principal objetivo transformar células e tecidos em preparações para serem utilizadas em microscopia ótica. Com esta técnica é efetuado o estudo e análise dos tecidos biológicos, observando a sua estrutura, que compreende várias etapas sequenciais devido às características dos tecidos, dos reagentes e do equipamento. O tecido é submetido a cortes finos, sendo posteriormente fixado e corado, de forma a permitir a observação das amostras por transiluminação e coloração, utilizando um microscópio ótico [73].

# Capítulo 3

## Materiais e Métodos

Este capítulo irá abordar todos os materiais e métodos utilizados neste estudo. Inicialmente, irão ser referidas as linhas celulares utilizadas e, posteriormente, a respetiva cultura de células, a preparação dos chás e extratos selecionados e as experiências realizadas.

### 3.1. Linhas celulares utilizadas

As linhas celulares WiDr (ATCC® CCL-218TM), derivada de um adenocarcinoma do cólon humano, e MCF7 (ATCC® HTB-22TM), derivada de um adenocarcinoma de mama de humano, são células epiteliais e aderentes. O meio de cultura sugerido pelo fornecedor é o EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*), com 2 mM de glutamina e 1% de NEAA (aminoácidos não essenciais, do inglês *non essential amino acids*), com FBS (soro fetal bovino) a 10% e 1% de antibióticos Pen/Strep (penicilina/estreptomicina), renovado entre duas a três vezes por semana. No entanto para o estudo foi utilizado DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco® 1x, 11966-025, RU) com 1% de L-glutamina (Biowest, L-Glutamine 100x, 200mM, XO55O-100, EUA), que é uma modificação enriquecida do meio anteriormente referido, igualmente com FBS (Sigma-Aldrich®, F7524, EUA) a 10% e 1% de antibióticos Pen/Strep (Lonza Pen Strep, Amphotericin, B 100x, 17-745E, EUA). A cultura destas células deve decorrer em frascos estéreis e ventilados, apropriados para células aderentes, numa estufa dedicada a uma temperatura de 37°C, com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de humidade. A cultura celular sub-confluyente (70-80%) deve ser expandida utilizando tripsina a 0,25%, colocando de novo na estufa nas condições de cultura durante 5 a 7 min com controlo ao MOCF (microscópio ótico de contraste de fase) [21].

#### 3.1.1. Diferenciação entre EMEM e DMEM

O EMEM é uma solução equilibrada de sal, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio. É formulado com uma concentração reduzida de bicarbonato de sódio

(1 500 mg/l), para ser utilizado com 5% de CO<sub>2</sub>. É geralmente reforçado com suplementos adicionais de FBS, tornando-o mais adequado para uma gama mais ampla de células mamíferas [74].

Por sua vez, o DMEM é um meio mais completo: tem quase o dobro da concentração de aminoácidos, o quádruplo da quantidade de vitaminas presentes no EMEM, assim como nitrato férrico, piruvato de sódio e aminoácidos suplementares, sendo este um dos principais motivos pelo qual se optou por utilizar este meio em detrimento do EMEM [74].

A formulação original continha 1 000 mg/l de glicose e foi utilizada inicialmente para a cultura de células embrionárias de ratos. Todavia, uma variação adicional com 4 500 mg/l de glicose provou ser ideal para a cultura de vários tipos celulares. Para além disso, o DMEM contém ferro e vermelho de fenol, para indicador de pH, o que permite uma constante monitorização da atividade celular [74].

O DMEM, sendo um meio básico, não contém proteínas nem agentes promotores do crescimento. Portanto, são necessários suplementos adicionais para que seja um meio “completo” sendo, por isso, adicionado FBS com a concentração desejada, normalmente 5 a 10%. O DMEM utiliza um sistema de tampão de bicarbonato de sódio (3,7 g/l) e, por isso, necessita de níveis artificiais de CO<sub>2</sub> para manter o pH necessário (geralmente 5%) [74].

## 3.2. Obtenção das células pretendidas

Qualquer uma das linhas celulares utilizadas neste trabalho requer métodos semelhantes e específicos para cultura *in vitro*.

As linhas celulares utilizadas neste estudo – WiDr (ATCC® CCL-218™) e MCF7 (ATCC® HTB-22™) – foram adquiridas à ATCC pelo Instituto de Biofísica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) [21], [40].

Após a receção das linhas celulares, é necessário mantê-las a uma temperatura abaixo de -130°C, preferencialmente em azoto líquido, até serem utilizadas, assegurando assim um nível elevado de viabilidade celular [21], [40]. Foram efetuadas várias alíquotas numeradas a partir da propagação das amostras originais, que foram mantidas congeladas em azoto

líquido (ThermoNorma, Cryoplus 1) a  $-190^{\circ}\text{C}$ . Por uma questão de funcionamento logístico e regras de funcionamento das instalações, por períodos muito curtos de preservação, as alíquotas podem ser mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , numa arca frigorífica dedicada apenas a este fim (Thermo Scientific, Herafreeze HFUT Series, EUA) regularmente revista por uma empresa certificada (Certilab, Portugal).

### 3.2.1. Cultura celular

Ao iniciar o estudo com as linhas celulares WiDr e MCF7, dado que as alíquotas estavam congeladas, foi necessário realizar a sua cultura celular. As células são mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  numa atmosfera humidificada (95% de humidade relativa) e rica em 5% de  $\text{CO}_2$  numa incubadora apropriada (Certilab, 06-10960, Portugal; Hera Cell 150-Thermo electron corporation, EUA), regularmente revista por uma empresa certificada (Certilab, Portugal). Sendo células aderentes, utilizaram-se frascos estéreis e apirogénicos apropriados e os meios específicos adaptados ao seu crescimento.

A cultura celular decorre dentro de uma câmara de fluxo laminar e é obrigatório que todos os materiais estejam esterilizados. Para garantir que há a melhor desinfeção possível de todo o material que se utiliza dentro desta câmara utilizou-se aspersão com álcool a 75% (Emaure<sup>®</sup>, K46525683 516, Alemanha). A sala de cultura encontra-se a uma pressão negativa e é necessário tomar as devidas precauções para que não ocorram contaminações: uso de bata dedicadas; luvas e, em algumas condições, máscaras; abertura desfasada das portas de acesso à sala e antecâmara e da antecâmara para o corredor.

Após retirar as amostras selecionadas da arca de  $-190^{\circ}\text{C}$  a descongelação deve ocorrer o mais rápido possível num banho de água termostaticado<sup>3</sup> a  $37^{\circ}\text{C}$  (Tissue water bath, GFL 1002, Alemanha, certificado pela Staff&Line). De seguida os tubos de congelação são aspergido com álcool a 75% para entrar na câmara de fluxo laminar e transfere-se a suspensão celular para um tubo de *Falcon* estéril de 15 ml (SARSTED 15 ml, 62.554.502, Alemanha) e acrescentam-se cerca de 3 ml de meio DMEM completo para inibir a ação do agente de congelação normalmente usado para o processo de criogenia [DMSO (dimetilsulfóxido) a 10% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, dimethyl sulphoxide, D2650 5×5 ml, EUA)]. Os *Falcons* são centrifugados a 1 100 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . De novo na câmara de fluxo,

---

<sup>3</sup> A água do banho termostaticado tem de ser mudada regularmente e é adicionada azida de sódio a 1% como agente antifúngico.

é descartado o sobrenadante e o *pellet* é ressuspendido em 1-2 ml de DMEM completo. No início as células são cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, 25 cm<sup>2</sup> Cell Culture Flask, 430693, EUA) com, como referido, meio DMEM com 10% de FBS, 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico Pen/Strep; isto é, DMEM completo. Quando o número de células é maior pode efetuar-se a cultura em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, 75 cm<sup>2</sup> Cell Culture Flask, 43639, EUA), nas condições descritas.

As células foram sendo observadas ao MOCF (Nikon Eclipse, TS100, Japão), pois a observação decorre sem utilização de corante. De notar que o DMEM completo é vermelho, uma vez que contém vermelho de fenol. Este componente funciona como indicador de pH e, à medida que as células vão crescendo ou se vão dividindo, libertam substâncias do seu metabolismo que acidificam o meio, tornando-o alaranjado ou amarelado. Deste modo, tornou-se possível verificar diariamente a necessidade de mudar ou não o meio, geralmente duas a três vezes por semana, até as células atingirem cerca de 70% de confluência. Utilizando maiores ampliações ao MOCF (geralmente 200 – 400 ×), foi possível controlar se surgiam contaminações bacterianas e, caso surgissem, descartar imediatamente o frasco correspondente e destruir a suspensão celular com hipoclorito de sódio (Sigma, S7653, EUA).

Após estes procedimentos de rotina continua-se a cultura celular com mudança de meio se necessário, nas condições referidas anteriormente, ou descolam-se utilizando um método enzimático, com tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich®, Trypsin Solution T4049-500 ml, EUA), tal como refere o fornecedor. Se apenas for necessário substituir o meio de cultura aspira-se todo o meio presente dentro do frasco com um pipetador automático (Gilson, Pipetting Aid 080333, França) com pipetas de vidro estéreis acopláveis (VWR, Pasteur Pipettes 612-1702, França), de forma a retirar também todas as células em suspensão. De seguida, coloca-se meio novo dentro do frasco que se asperge com álcool a 75% e se recoloca dentro da estufa de cultura. Se for necessário descolar as células para continuar a sua cultura em novos frascos, aspira-se, tal como referido previamente, o meio presente e colocam-se no frasco entre 6 a 7 ml da solução de tripsina a 0,25%. Este/s frasco/s é/são recolocado/s na incubadora nas condições anteriormente descritas, após aspersão com álcool a 75%. Para que a tripsina atue eficazmente, deixaram-se as células WiDr na estufa durante cerca de 7-10 minutos e as células MCF7 durante cerca de 5 minutos, valores estes otimizados em experiências anteriores [14], [75]. De forma a inativar a reação enzimática, após verificação ao MOCF de que a maioria das células está em suspensão,

adicionaram-se entre 1 a 2 ml de DMEM completo e recolheu-se a suspensão celular para *Falcons* de 15 ml, estéreis e identificados, utilizando o mesmo pipetador.

Para se concentrarem as células da suspensão, procedeu-se à centrifugação dos *Falcons* a 1 100 rpm, a uma temperatura de 4°C, durante 5 minutos (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge, 1 L-R, EUA certificada pela Certilab). Assim, tornou-se possível a separação do *pellet* do sobrenadante. Uma vez mais, dentro da câmara de fluxo laminar, em condições estéreis, descartou-se o sobrenadante e reservou-se o *pellet*.

De forma a ressuspender o *pellet*, adicionou-se 1 ml de meio de cultura, neste caso, DMEM completo com FBS a 10%, e transfere-se a suspensão celular para outros frascos com as mesmas características dos utilizados anteriormente. Por fim, colocam-se na incubadora para que as células continuem a proliferar.

### 3.2.2. Contagem celular

Para criopreservar células ou iniciar qualquer estudo celular é necessário saber de que número de células se dispõe e selecionar o número específico de células pretendido. Para tal, efetua-se o protocolo de descolamento celular, tal como já descrito, e do *pellet* ressuspensão normalmente em 1 ml de meio de cultura, recolhem-se 10 µl de suspensão celular para um *ependorf* estéril de 2 ml (DeltaLab S.L., microtubo 2 ml tapon plano 4092.7N, Espanha). Com o intuito de contar o número de células viáveis na suspensão celular, utilizou-se um corante vital capaz de atravessar a membrana das células mortas, corando apenas as que não estão viáveis. Assim, já fora da câmara de fluxo laminar, adicionaram-se 10 µl de azul tripano (Sigma-Aldrich®, Azul Tripano T0776, EUA) preparado a 4% com água destilada (Sigma, T8154, EUA) e homogeneizou-se a solução. De seguida, pipetaram-se 10 µl da mistura que se colocaram numa câmara de *Neubauer* (Neubauer improve, 0640030, Alemanha) sob uma lamela de vidro (RS, Cover Glass 100 PCS Thickness 0,13-0,17 mm, França). Esta câmara permite efetuar a contagem de células ao microscópio ótico [76]. Caso não houvesse nenhuma contaminação bacteriana, a contagem celular era iniciada.

No centro da área delimitada em cada metade da câmara de *Neubauer*, é possível observar várias linhas perpendiculares e paralelas entre si, que delimitam 9 quadrados grandes, cada um de 1 mm<sup>2</sup> (Figura 6). Estando 4 destes quadrados nos respetivos cantos da quadrícula, é possível observar que cada um deles está dividido em 16 quadrados, cada

um com 0,25 mm de lado. A concentração celular é efetuada utilizando os 4 quadrados dos cantos e calculando o número médio de células por quadrante. Para se fazer a leitura, caso a solução esteja bem homogeneizada e não em grumos por quadrado, segue-se um trajeto serpenteante no esquema dos 16 quadrados de cada quadrante, contando o número de células dentro de cada um desses quadrados. Se se observarem células sobre os traços da quadrícula não são contabilizadas. Uma vez que o volume de cada quadrante é de  $0,1 \text{ mm}^3$ , tendo em conta a profundidade definida de 0,1 mm entre a câmara e a lamela, o número total de células de um quadrante revela quantas células temos em 0,0001 ml. Isto significa que o número total por quadrante irá ser de  $\times 10^4$  células/ml [74], [77].

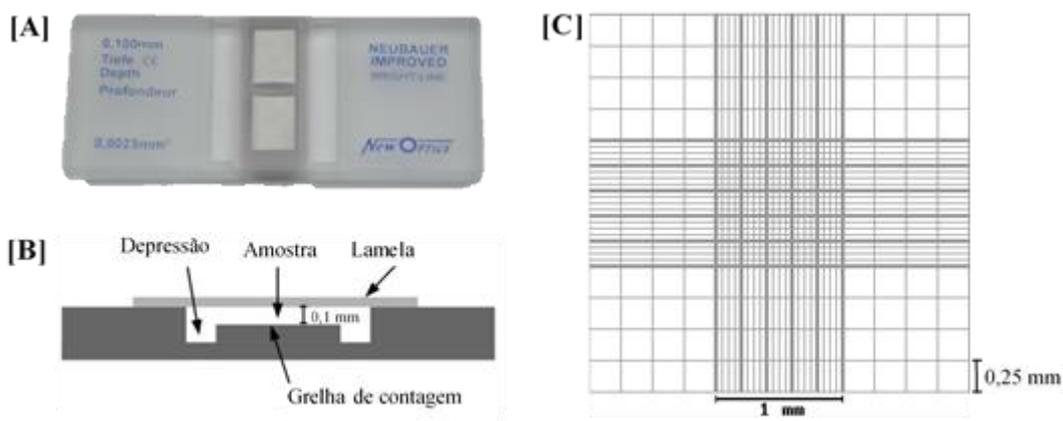


Figura 6 – [A] Câmara de Neubauer (adaptado de [78]); [B] Vista lateral da lamela colocada sobre a câmara de Neubauer, cobrindo a área central onde está a gelha de contagem, que serve para conter a amostra entre o fundo da câmara e a própria lamela (adaptado de [77]); [C] esquema de quadrantes utilizado na contagem de células (adaptado de [78]).

Usando este método de contagem celular, foi possível saber-se o número de células viáveis presentes. O procedimento seguinte depende da finalidade: criopreservação ou início de estudo.

A criopreservação faz-se em criotubos específicos para esse fim com um volume de 1,5 ml (SARSTED, 72380992, Alemanha). À suspensão celular em meio completo adicionou-se DMSO estéril a 10%, uma vez que é um agente criopreservante que faz com que a água presente nas células demore a cristalizar. Assim, as células conseguem sobreviver mais facilmente [79]. Os tubos de criopreservação, já com a suspensão celular, são devidamente identificados – é escrito no rótulo o tipo celular, número de células no

volume contido, data de criopreservação, o número de passagem e o nome do investigador. É registado o *stock* destes tubos para utilização futura. De seguida, foram colocados numa arca frigorífica dedicada apenas a este fim a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Caso não se conseguisse garantir que iriam ser utilizadas dentro de prazo curto/médio, passadas no máximo 3 semanas, esses tubos seriam transferidos para uma câmara de azoto líquido a  $-190^{\circ}\text{C}$ , e a sua alocação registada nas *racks* de armazenamento.

Caso se pretendesse iniciar um estudo *in vitro*, a suspensão celular estava pronta a ser diluída e semeada nas condições desejadas, ou então ser utilizada para estudos *in vivo*, efetuando-se o protocolo selecionado.

### 3.3. Utilização de chá verde e extratos de chá verde

Uma vez que o composto polifenólico selecionado para estudo neste trabalho, a (–)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), a catequina mais abundante no chá verde e considerada o principal responsável por vários benefícios para a saúde já referidos, nomeadamente o efeito onco-preventivo [45], [46], foi feita uma pesquisa de mercado para determinar os chás verdes existentes. Verificou-se que há disponíveis no mercado nacional e internacional (vários países da Europa, México e EUA) muitas marcas registadas e brancas de chá verde, bem como sob a forma de extratos vegetais.

#### 3.3.1. Determinação das concentrações de EGCG no chá

Para se decidir quais dos chás verdes a estudar, era necessário determinar se a concentração de EGCG presente em cada um deles era semelhante ou não consoante a marca e ser chá ou extrato. Neste contexto, utilizou-se a técnica HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão, do inglês *high-performance liquid chromatography*). Este método analítico tem por objetivo a separação, identificação e quantificação das substâncias químicas presentes numa amostra, através de um mecanismo de interação entre as moléculas deste e de duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária corresponde à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido onde se encontra depositado um material de enchimento formado por pequenas partículas. A fase móvel corresponde ao solvente, que flui continuamente através do sistema, arrastando o composto injetado na coluna cromatográfica e lido pelo detetor.

As substâncias presentes no chá, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de diferentes graus de afinidade para com as fases móvel e estacionária. Consequentemente, as suas velocidades de migração são igualmente distintas, o que permite que a separação cromatográfica seja conseguida. Pode, então, concluir-se que a substância com maior afinidade para a coluna é aquela que elui por último e, em contrapartida, a substância que elui primeiro será a de menor afinidade com o enchimento (fase estacionária) [80].

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

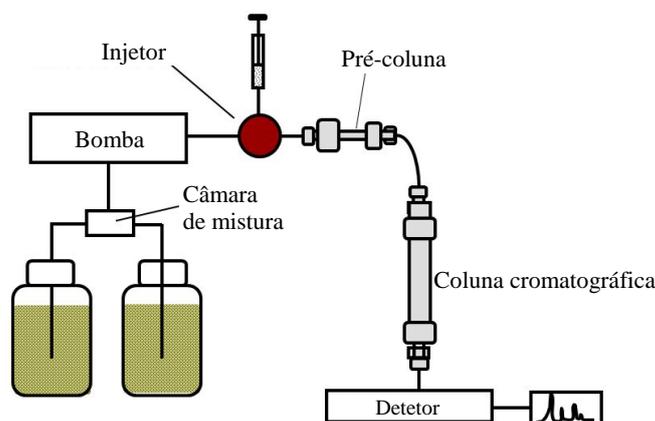


Figura 7 – Representação esquemática de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (adaptado de [80]).

Para os estudos por HPLC foram preparados chás verdes de várias marcas registadas e brancas de acordo com um protocolo adaptado pelo grupo de investigação (Figura 8). O procedimento utilizado para a preparação dos chás foi iniciado com a colocação de 200 ml

de água da torneira num *goblet*, juntamente com uma saqueta de chá e um magnete de 1 cm para que a mistura fosse agitada homogeneamente, sobre uma placa quente magnética (Jenway, hotplate and stirrer 1000, RU). Utilizou-se um termómetro de laboratório para controlar a temperatura até 90°C – sem nunca atingir os 95°C para não deixar ferver. Manteve-se esta temperatura durante 5 minutos com agitação. Depois retirou-se o magnete e deixou-se arrefecer o chá, colocando-o à temperatura ambiente, durante cerca de 2 horas, no escuro, de forma a garantir que a sua composição não era alterada pela luz. Após este período de tempo, retirou-se a saqueta de chá, comprimindo-a contra as paredes do *goblet* para recuperar ao máximo a solução. Com uma proveta, mediu-se, no fim, quanto é que a decocção havia evaporado, tendo sido, em média, cerca de 20 ml, passando de um volume inicial de 200 ml para um volume final de 180 ml. Armazenou-se em copo fechado no escuro a 4°C.

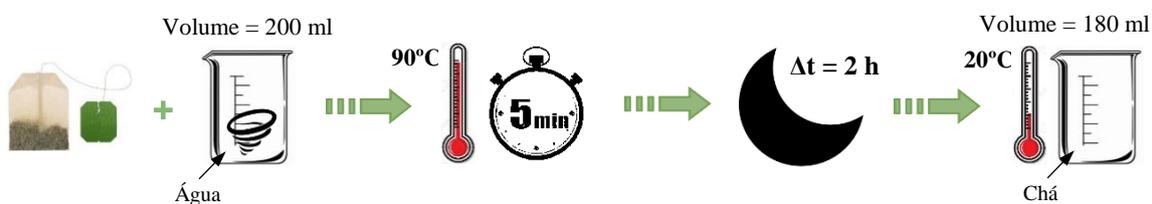


Figura 8 – Representação esquemática do protocolo de preparação de uma solução de chá verde a estudar, usando uma saqueta de chá verde.

Os chás verdes estudados foram das marcas: Cem Porcento (Cem Porcento, Chá Verde, Algas e Fibras, 10 × 1,8 g, Portugal), Gorreana (Gorreana, Chá Verde Hysson 20 × 2 g, Portugal), Lipton (Lipton, Green Tea Classic, 20 × 1,4 g), Pingo Doce (Pingo Doce, Chá Verde, 20 × 1,8 g), Solúvel (Ignoramus, Chá Verde Solúvel, 10 × 6 g, Portugal), Taylors (Royal Botanic Gardens Kew, Taylors, Pure Sencha Green Tea, 20 × 1,5 g, RU), Tetley Mel e Limão (Tetley London 1837, Mel e Limão Green Tea, 10 × 1,5 g, Inglaterra) e Twinings (Twinings™ of London, Pure Green Tea, 25 × 2 g, Inglaterra). Além dos chás verdes foram estudadas extratos de chá verde: em pó GTE (MyProtein®, Green Tea Extract powder 500 g, I705807841, RU) e sob a forma de cápsula, MGTE (MyProtein®, Mega Green Tea Extract™, 90 cap 450 mg, RU) e GTEE (ProHealth, Green Tea EGCG Extreme™, 100 veggie capsules, 390 mg EGCG cap, PH395, RU, certificado pelo Laboratory Purity&Potency). A escolha destes chás verdes e seus extratos recaiu não só sobre a quantidade de chá por saqueta e/ou a percentagem de EGCG que os fabricantes indicavam, mas também sobre a sua popularidade entre os consumidores, uma vez que se pretendiam estudar os mais consumidos pela população e

os mais facilmente adquiridos, quer em Portugal quer pensando numa globalização mais abrangente (Europa e EUA).

Desta forma, ao proceder a uma separação cromatográfica através da técnica de HPLC e ao respetivo tratamento dos dados com *software* adequado, obteve-se uma representação gráfica: o cromatograma com vários picos correspondentes aos diferentes componentes de cada amostra. Esta técnica foi efetuada 3 vezes para cada amostra de cada preparado para garantir a fiabilidade dos resultados. Para além disso, os chás foram também analisados após estarem expostos à claridade durante 7 dias, para se determinar se o composto era sensível à luz e se a concentração de EGCG era alterada nestas condições. Foi concluído que, embora a cor dos chás se altere após exposição à claridade e, conseqüentemente, a composição de alguns dos seus componentes, esta alteração não afetava a concentração do EGCG presente, visto que os resultados dos testes do HPLC foram idênticos.

Através dos cromatogramas obtidos, tendo por base os resultados de HPLC para o EGCG Puro (o mais puro do mercado) (Sigma-Aldrich®, E4143, EUA), que contém mais de 95% de EGCG, pôde ser quantificada a concentração de EGCG presente em cada um dos chás/extratos estudados (por grama de chá/extrato), já que o equipamento dispõe de um *software* dedicado associado.

Com base nos resultados obtidos foi possível preterir alguns chás para o estudo posterior com as linhas celulares tumorais, optando pelos mais preferenciais e adequados. Para além da concentração de EGCG presente, no caso de valores semelhantes, também foram tomados em consideração outros fatores como o preço, a disponibilidade e facilidade da obtenção dos chás/extratos no mercado, pois são fatores que influenciam a decisão de compra do consumidor.

O processo para a análise por HPLC foi repetido utilizando chás preparados pelo mesmo protocolo, mas usando duas e três saquetas. Como os volumes a utilizar, partindo de uma saqueta em 200 ml, para obter as concentrações desejadas de EGCG, eram consideráveis para os estudos *in vitro*, consoante as marcas de chá selecionadas, e podiam alterar a relação meio/solução diariamente adicionada, sendo mais um fator a considerar, optou-se por tentar aumentar a dose usando mais saquetas no mesmo volume. De acordo com a revisão bibliográfica, os resultados para a marca Lipton são consistentes ao longo do tempo e localização geográfica, pois para duas saquetas é concordante com os valores

obtidos neste estudo para uma saqueta. Considerou-se ainda uma possível utilização de três saquetas no mesmo volume. Desta forma seria possível realizar estudos *in vitro* com uma concentração mais adequada num menor volume. Os estudos de HPLC são essenciais para obter informação nestas duas novas condições experimentais para todas as marcas de chá.

### 3.3.2. Estudos *in vitro* usando chás verdes

Após análise de todos os fatores mencionados anteriormente, foi feita uma seleção dos chás que seriam utilizados para o estudo celular *in vitro*. Assim, escolheram-se chás verdes das marcas Lipton, Twinings, Taylors, Tetley Mel e Limão e Pingo Doce.

Os chás, utilizando uma, duas e três saquetas, foram sempre preparados de acordo com o protocolo descrito (página 40, Secção 3.3.1 Determinação das concentrações de EGCG no chá). Os chás preparados foram filtrados em ambiente estéril com um filtro apropriado (GE Healthcare, Whatman™, filtro 0,20 µm 10462200, Alemanha) e, de acordo com estudos anteriores, a partir destes chás foram efetuadas soluções *stock* em tubos *Falcon* de 15 ml e mantidas no escuro a -20°C [14], [81].

### 3.3.3. Soluções de extratos de chá verde enriquecidos em EGCG

O referido protocolo para estudos por HPLC foi igualmente utilizado para determinar a concentração de EGCG presente em cada um dos extratos. Foram utilizadas cápsulas de diferentes fabricantes: GTEE e MGTE, e GTE em pó. Segundo as informações dos fabricantes cada cápsula de GTEE tinha 390 mg de EGCG/cápsula, para MGTE seriam 180 mg de EGCG/cápsula e o GTE em pó teria aproximadamente 10% de EGCG por pacote. Para as soluções *stock* utilizou-se PBS (tampão fosfato-salino estéril, do inglês *phosphate buffered saline*) preparado no laboratório e autoclavado, com 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac, 1319651211), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 137 mM de NaCl (Sigma, S7653, EUA), 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 6580, Alemanha) e água ultrapura (Millipore, Biocel Q-Gard® 1, EUA), para perfazer 500 ml, e acertado para um pH de 7,4. O tampão é colocado num frasco Schott de 500 ml estéril (Duran, 00361668, Alemanha) rotulado, com a rolha protegida com papel de alumínio e com fita de segurança para autoclavagem, e vai a esterilizar por autoclave. As soluções *stock* preparadas, devidamente identificadas,

foram congeladas em alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegidas da luz. A partir destas alíquotas *stocks*, filtradas em ambiente estéril com filtros de  $0,2\ \mu\text{m}$ , como referido anteriormente (página 42, Secção 3.3.2 Estudos *in vitro* usando chás verdes), fizeram-se as diluições necessárias, de forma a obter as concentrações desejadas para os diferentes ensaios.

Para realizar os estudos *in vivo*, foi utilizada e preparada uma solução de GTE em pó com uma concentração de  $1625\ \text{mg/l}$  de EGCG; teoricamente, 5 vezes mais que a necessária para produzir uma concentração plasmática de  $0,1\ \mu\text{g/ml}$  num humano [82]. A solução foi preparada num litro de água corrente, utilizando para a pesagem uma balança analítica eletrónica (Radlag, AS 220/c/2, Alemanha). De seguida, o pó era colocado num *Erlenmeyer* e adicionado o volume previamente medido de água corrente. A solução foi bem homogeneizada para obter uma dissolução completa do pó.

### 3.4. Estudos *in vitro*

Os ensaios *in vitro* permitem testar, de forma mais standardizada, linhas celulares específicas. É possível obter avaliações quantitativas e qualitativas mais corretas e homogéneas, uma vez que estes testes são realizados em condições estéreis reprodutíveis. Após os ensaios de propriedades físico-químicas, os estudos *in vitro* são os primeiros a ser realizados para tentar acertar e padronizar condições experimentais e prever reações *in vivo*. Tendo por base os dados selecionados a partir dos ensaios *in vitro* prossegue-se com os estudos *in vivo*. Os testes *in vitro*, tendo em conta que são realizados em ambiente estéril e com condições padronizadas, têm a mais-valia de controlar melhor variáveis externas que ajudam a diminuir significativamente o número da amostra nos estudos *in vivo*.

Os maiores estudos com as duas linhas celulares WiDr e MCF7 decorreram em simultâneo, embora independentes um do outro.

#### 3.4.1. Objetivos gerais

Resumidamente, o objetivo deste estudo é testar e analisar o possível efeito do agente natural EGCG, presente em maior percentagem no chá verde e em extratos de chá verde, no tratamento de cancro colorretal e da mama. Sendo o chá verde um produto biológico acessível e dado o efeito sinérgico do EGCG com vários compostos e fármacos descritos

na literatura [13], [49], [50], [65], o trabalho decorreu efetuando ensaios de diferentes condições e concentrações deste produto que poderão vir a ser recomendadas para grupos de doentes com tipos de tumores semelhantes aos desenvolvidos por estas linhas celulares, de forma a melhorar a sua qualidade e tempo de sobrevivência. O objetivo será poder contribuir para uma diminuição das doses ou ciclos terapêuticos com fármacos bastante citotóxicos, utilizados nos dias de hoje, e subtipos tumorais mais agressivos<sup>4</sup>. Para além disso, pretende-se conseguir informar a população, nomeadamente a europeia, da importância de aumentar o consumo desta infusão, dados não só os seus efeitos terapêuticos como preventivos.

### 3.4.2. Estudo da linha celular WiDr

Estudos anteriores com a linha celular WiDr, efetuados no Instituto de Biofísica, definiram o protocolo de cultura *in vitro* (página 33, Secção 3.2. Obtenção das células pretendidas) [14]. Nesses estudos foram utilizadas caixas de cultura de 96 poços (Costar<sup>®</sup>, Corning Incorporation, 3596, EUA) (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e humidade 95%). Foi otimizado o número de células por poço:  $2,4 \times 10^4$  células WiDr num volume de 150 µl de DMEM completo por poço. Foi também otimizado o tempo de aderência, tendo-se verificado que o tempo necessário de cultura para que as células aderissem à superfície para efetuar de seguida as experiências era de 48 horas [14].

Neste estudo, para tentar simular o consumo diário de EGCG, foi readicionada a cada 24 horas o mesmo volume de soluções com concentração pré-determinadas de EGCG, preparadas a partir da cápsula GTEE. Desta forma efetuou-se uma exposição crónica aos polifenóis, tendo como base o consumo diário de extrato de chá verde e o metabolismo celular do EGCG. Foi estudado o efeito de 1, 2, 3, 6, 9 e 12 reaplicações do EGCG, ou seja, aplicações repetidas às 24, 48, 72, 144, 216 e 288 horas de incubação. Para cada um destes tempos de incubação, para avaliar o efeito das várias reaplicações do EGCG, foram estudadas concentrações de 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 µl/ml de EGCG [14].

Foi concluído que, para a linha celular WiDr, o EGCG é mais eficaz na redução da viabilidade celular às 3 e 6 reaplicações, para as concentrações de 0,5 e 5 µl/ml. De notar que foram feitos vários ensaios para todos estes testes, de modo a aumentar a fiabilidade

---

<sup>4</sup> De notar que foram realizados estudos recentes pelo grupo, no Instituto de Biofísica-IBILI-FMUC, com a linha celular de adenocarcinoma do colon WiDr que demonstraram o efeito benéfico da sinergia entre fármacos usados na sua quimioterapia e o EGCG [14].

dos resultados, tendo sido comparados e normalizados ao controlo. Isto é, para todos os ensaios foram efetuados poços de controlo, que continham o mesmo número de células por poço, mas não foram adicionadas soluções com EGCG. Assim, foi possível comparar e analisar as diferenças de comportamento e viabilidade das células com e sem aplicações de EGCG [14].

Inicialmente, ao utilizar infusões de chás comerciais (quatro marcas de chá verde mencionadas – Lipton, Twinings, Tetley Mel e Limão e Pingo Doce), para obter as concentrações de 0,5 e 5  $\mu\text{l/ml}$  de EGCG utilizou-se uma saqueta de chá em 200 ml<sup>5</sup>. Os valores das concentrações de EGCG, em cada saqueta destas marcas, foram obtidos por HPLC (página 38, Secção 3.3.1. Determinação das concentrações de EGCG no chá), Verificou-se que, dadas as baixas concentrações de EGCG/saqueta em algumas marcas de chá, era preciso usar um volume considerável para atingir as concentrações desejadas. Para se conseguir uma proporção de meio de cultura, no volume total da mistura (meio de cultura e infusão), adequada ao metabolismo celular, seria necessário utilizar caixas de cultura com poços de maior volume (24 poços) (Costar®, Corning Incorporation, 3524, EUA). Pensando numa transposição de volumes experimentais para consumo diário humano, seriam volumes importantes, não adequados a doentes, por exemplo com problemas cardíacos e renais. Neste contexto, a estratégia foi tentar concentrar o EGCG usando 2 ou 3 saquetas para o mesmo volume de 200 ml. Verificou-se, através da análise por HPLC com duas e três saquetas, que esta abordagem seria viável. Assim, seria possível utilizar um volume exequível e obter as concentrações de EGCG pretendidas em caixas de poços de maior área [14].

Dados os volumes a utilizar para se obterem as concentrações desejadas, selecionou-se a caixa de cultura de 48 poços (Costar®, Corning Incorporation, 3548, EUA), cuja área superficial é de 0,95 cm<sup>2</sup>. Foi então necessário adaptar o número de células/poço a esta nova área, uma vez que nos testes anteriores se usaram caixas de cultura de 96 poços (área superficial é de 0,32 cm<sup>2</sup>). Sendo células aderentes, assumindo uma relação linear entre o número de células estudado anteriormente e a área superficial de cada poço ( $2,4 \times 10^4$  células/poço, para uma área de 0,32 cm<sup>2</sup>) com a área superficial de cada poço da nova caixa de cultura, foram testadas  $7 \times 10^4$  células WiDr/poço. Foram igualmente testadas  $3,6 \times 10^4$  células/poço e  $4,8 \times 10^4$  células/poço. Relativamente ao tempo de adesão

---

<sup>5</sup> Segundo as indicações dos fabricantes: 1 saqueta por chávena (200 ml), 3-5 min sem ferver.

pré-experimental, para a linha celular WiDr, verificou-se que este não dependia do tamanho dos poços, mantendo-se então as 48 horas padronizadas anteriormente [14].

Nas experiências utilizando  $7 \times 10^4$  células/poço, testaram-se todos os extratos com EGCG com uma concentração de  $5 \mu\text{l/ml}$  e com os chás verdes selecionados preparados com 3 saquetas. Tendo o EGCG mais efeito na viabilidade celular após 3 e 6 dias<sup>6</sup>, foram testadas estes tempos para todos os compostos referidos.

Nas experiências utilizando  $3,6 \times 10^4$  células/poço e  $4,8 \times 10^4$  células/poço, testaram-se tantos os chás verdes como os extratos de chá verde (página 40, Secção 3.3.1. Determinação das concentrações de EGCG no chá) com as concentrações que se tinha verificado obter mais efeito na viabilidade celular, isto é, com concentração de EGCG de  $0,5 \mu\text{l/ml}$  e  $5 \mu\text{l/ml}$ . Testaram-se os referidos chás verdes preparados usando duas e três saquetas e fizeram-se 3 aplicações em 3 dias consecutivos. Estes chás verdes têm cor, cheiro, concentração de EGCG e composição diferentes e, sendo fitoquímicos a interação entre os diversos componentes pode ser um fator importante na resposta obtida.

### 3.4.3. Estudo da linha celular MCF7

Tendo em vista os estudos anteriores realizados com a linha celular WiDr, pretende-se efetuar estudos do género com a linha celular MCF7 e, se alguma vez possível, tentar estabelecer correlações entre elas devido à utilização destes chás verdes ou extratos de chá verde.

Foi então estudado o efeito de várias concentrações de EGCG nos referidos chás verdes e extratos de chá verde com a linha celular MCF7, utilizando a cápsula GTEE, já utilizada nos estudos anteriores com a linha WiDr, em caixas de cultura de 96 poços. À semelhança do ensaio com a linha WiDr, estudaram-se concentrações de  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $0,5 \mu\text{g/ml}$ ;  $1 \mu\text{g/ml}$ ;  $5 \mu\text{g/ml}$  e  $10 \mu\text{g/ml}$  de EGCG usando extrato de GTEE. Fizeram-se aplicações 3 e 6 de cada dosagem uma vez por dia. Utilizou-se uma suspensão celular com  $2,4 \times 10^4$  células/poço, tendo como base os ensaios com a linha celular WiDr. Tendo em conta que o período de adaptação à nova superfície, o crescimento e o tempo de

---

<sup>6</sup> O protocolo efetuado anteriormente consistiu na aplicação da dose de EGCG selecionada/poço  $1 \times$  por dia, verificando-se que os melhores tempos foram 3 e 6 dias.

duplicação da linha celular MCF7 são mais lentos, aumentou-se o tempo pré-experimental para 72 horas, igualmente a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para otimizar o número de células MCF7 e o tempo de adesão pré-experimental a utilizar nos ensaios seguintes, realizaram-se estudos sem aplicação de EGCG, em caixas de 96 poços. Testaram-se mais 3 concentrações celulares:  $3,6 \times 10^4$ ,  $4,2 \times 10^4$  e  $4,8 \times 10^4$  células/poço e 3 tempos pré-experimentais: 48, 72 e 96 horas de adesão. Efetuaram-se estudos similares com a linha WiDr, podendo comparar em simultâneo o comportamento, relativamente a estes dois parâmetros: diferente número células/poço e tempo de adesão, destas duas linhas celulares. Uma vez mais, confirmaram-se os resultados obtidos anteriormente: para as células WiDr o melhor tempo de adesão pré-experimental eram 48 horas e a concentração celular de  $2,4 \times 10^4$  células/poço. Para a linha celular MCF7, o melhor tempo de adesão pré-experimental eram 72 horas e a concentração celular de  $4,8 \times 10^4$  células/poço para caixas de 96 poços.

Tendo em conta os volumes de chás a aplicar ao longo do tempo da experiência, fez-se o estudo em caixas de cultura de 48 poços utilizando  $4,8 \times 10^4$  células/poço, com um tempo de adesão pré-experimental de 72 horas. Foi estudado o efeito de 2, 3, 4, 6 e 8 aplicações dos diferentes chás e extratos a cada 24 horas, ou seja, às 48, 72, 96, 144 e 192 horas de experiência. Os extratos e os chás foram preparados de acordo com os protocolos já referidos com três saquetas e adicionados os volumes necessários de forma a obter uma concentração de EGCG de 5 µl/ml em cada poço, tanto nos chás como nos extratos.

Fazendo um raciocínio semelhante ao efetuado para as células WiDr, testaram-se mais duas concentrações celulares em caixas de 48 poços:  $7,2 \times 10^4$  e  $9,6 \times 10^4$  células/poço células/poço. A execução desta experiência justifica-se devido ao aumento da área do poço (caixa de 96 poços para caixa de 48 poços), mas usando o tempo de adesão pré-experimental de 72 horas, já otimizado para a linha MCF7. Aplicaram-se as soluções dos chás, preparados com duas saquetas, e dos extratos com concentrações de EGCG de 0,5 µl/ml e 5 µl/ml. Fizeram-se aplicações a cada 24 horas, em 3 dias consecutivos. Pretendia tentar obter-se também informação sobre uma possível inter-influência sobre o EGCG de outros componentes dos chás (alguns também presentes nos extratos).

A experiência usando  $9,6 \times 10^4$  células/poço ficou contaminada (devido a um problema de outros utilizadores da mesma estufa) no dia da última aplicação dos compostos com EGCG e, por isso, não foi possível obter resultados da viabilidade celular

das mesmas. Todavia, através da frequente visualização das células ao mofc, verificou-se que, se formaram cúpulas no fundo do poço, o que indica um número de células MCF7 demasiado elevado. A concentração de  $7,2 \times 10^4$  células/poço deu os melhores resultados para a caixa de 48 poços.

Assim, para a linha MCF7 a melhor conjugação foi de  $7,2 \times 10^4$  células/poço em caixas de 48 poços.

O espectro de HPLC confirma a existência de vários componentes, para além de uma concentração diferente de EGCG em cada marca, nos chás verdes. Da literatura na área da Fitoquímica sabe-se que muitas vezes, nas plantas, há inter-influência dos vários compostos [43].

Para atentar atingir o objetivo proposto de tornar possível uma diminuição das doses da quimioterapia ou redução do número de ciclos terapêuticos com os fármacos utilizados, analisou-se ainda o efeito do GTE pó em conjugação com alguns destes compostos. Pretendia analisar-se se haveria um efeito sinérgico benéfico entre eles. Todos os fármacos testados foram gentilmente cedidos pelo Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EMA (Agência Europeia do Medicamento) e utilizados na quimioterapia para tratamento oncológico do cancro da mama [25], [83]. Uma vez que no presente estudo se programaram os ensaios até às 6 aplicações, fazendo o MTT ao 7º dia, foi simulada uma semana de tratamento e, por isso, os fármacos e a sua dosagem foram escolhidos e adaptados para estas condições.

Foram escolhidos fármacos antineoplásicos aplicados na clínica em doses baixas, permitindo uma administração por semana. Neste contexto foram selecionados tratamentos com antraciclinas, como a doxorrubicina (Sigma, 44583, EUA), com uma administração de  $60 \text{ mg/m}^2$  [59], [63]; com antimetabólitos, como a capecitabina (Actavis, Capecitabina Actavis 150 mg, EUA), com uma administração de  $1000 \text{ mg/m}^2$  [57], [58], e o 5-fluoracilo (Sigma, F6627, EUA), com uma administração de  $450 \text{ mg/m}^2$  [55], [56]; e com antimicrotúbulos, como o paclitaxel (Actavis, Paclitaxel Actavis 6 mg/ml, EUA), com uma administração de  $175 \text{ mg/m}^2$  [59], [60], e o docetaxel (Actavis, Docetaxel Actavis 20 mg/ml, EUA), com uma administração de  $60 \text{ mg/m}^2$  [59], [61]. Estas administrações foram escolhidas tendo em conta as doses para o adulto [38]. Como mencionado, utilizou-se

apenas uma aplicação de cada fármaco, enquanto com o GTE pó se mantiveram as 3 aplicações no protocolo referido, com concentrações de EGCG de 0,5 µl/ml e 5 µl/ml, utilizando  $7,2 \times 10^4$  células MCF7/poço, em caixas de 48 poços, com um período pré-experimental de 72 horas. Como em todas as experiências descritas, preparam-se poços na caixa de cultura apenas com a suspensão celular, que foram utilizados como controlos. Também se prepararam poços para a aplicação de cada fármaco (1 aplicação no tempo zero), com o mesmo número de células, para analisar não só o seu efeito, como a diferença do mesmo com e sem o referido extrato de chá verde.

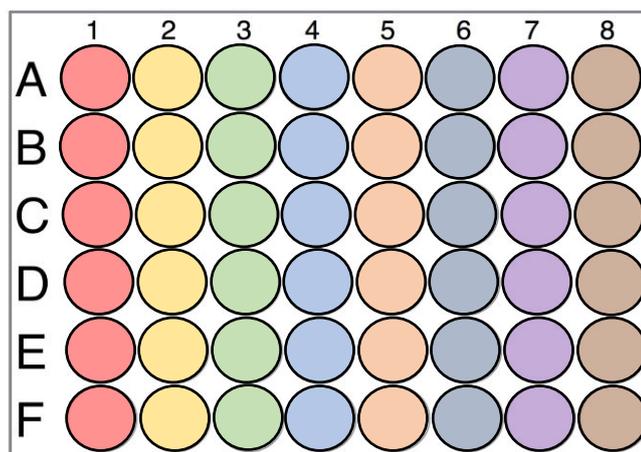
#### 3.4.4. Estudo com chás e extratos de chá verde

Foram feitos os cálculos relativos ao volume de cada chá e extrato que seria inserido, no decorrer de toda a experiência, em cada poço, garantindo que a mesma concentração de EGCG seria colocada em cada poço, tendo em atenção que esta varia consoante o chá e extrato. O volume máximo atingido em cada poço foi de 800 µl (englobando o volume de meio e de chá/extrato adicionados), de modo a garantir que não havia contacto do líquido entre poços vizinhos e evitar contaminações.

Para o estudo com os chás verdes e extratos de chá verde procedeu-se sempre da mesma forma, começando por semear a suspensão celular, com o número de células estipulado, diretamente sob o fundo do poço. Fizeram-se várias réplicas de cada condição por poço, de forma a aumentar os dados estatísticos e a fiabilidade dos resultados.

É importante realçar que em todas as experiências com ambas as linhas celulares estudadas (WiDr e MCF7) se efetuaram grupos de controlo. Assim, os resultados obtidos para os poços com adição de substâncias eram sempre comparados com este grupo.

Apresenta-se um exemplo de um esquema de uma das caixas de cultura celular utilizadas numa experiência com chás veres e seus extratos (Figura 11). Cada coluna contém as mesmas concentrações para o mesmo chá/extrato em análise, ou seja, são réplicas para aumentar a fiabilidade dos resultados.



-  Suspensão celular em DMEM completo
-  Suspensão celular em DMEM completo + chá Lipton
-  Suspensão celular em DMEM completo + chá Twinings
-  Suspensão celular em DMEM completo + chá Tetley Mel e Limão
-  Suspensão celular em DMEM completo + chá Pingo Doce
-  Suspensão celular em DMEM completo + pó GTE
-  Suspensão celular em DMEM completo + cápsula MGTE
-  Suspensão celular em DMEM completo + cápsula GTEE

Figura 9 – Exemplo de um esquema de uma caixa de cultura celular de 48 poços utilizada no estudo do EGCG presente nos diferentes tipos de chá verde estudados.

### 3.4.5. Teste do MTT

O teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, ou seja, a proliferação celular e a citotoxicidade dos materiais utilizados nos estudos *in vitro* [84].

O composto MTT possui na sua estrutura um anel de tetrazólio, que lhe confere uma cor amarela. Devido à atividade mitocondrial das células ativas, este composto é reduzido a cristais de *formazan*, com cor azul-escura/arroxeadas (Figura 10) [84].

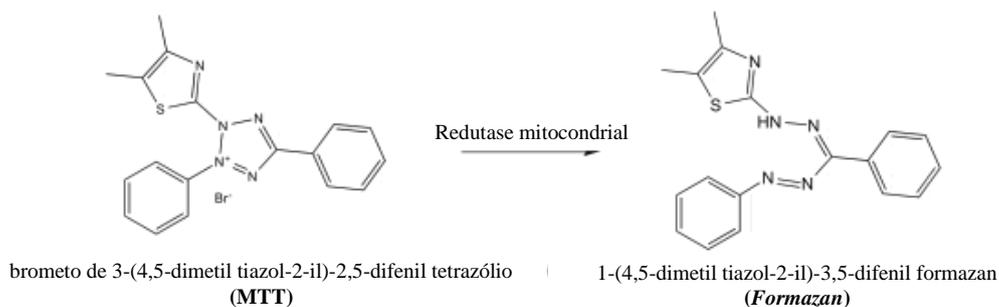


Figura 10 – Esquema da redução do MTT a *formazan*. Esta reação apenas pode ocorrer quando as enzimas redutoras estão ativas. Esta conversão é, portanto, usada para quantificar a viabilidade celular (adaptado de [84]).

Em condições estéreis, o meio foi totalmente retirado de cada poço e, de seguida, tendo em conta o volume/poço, foram adicionados 10% de MTT (Sigma, M2128, EUA) e 90% de meio de cultura novo. A caixa de cultura foi colocada, de seguida, na incubadora a uma temperatura de 37°C num ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4 horas, podendo no final ser observada ao MOCF (Figura 11). Após este período de tempo, a solução contida em cada poço foi retirada e substituída por isopropanol ácido (volume igual ao usado para a mistura de meio e MTT). Não é necessário realizar estes dois procedimentos na câmara de fluxo, já que a membrana das células viáveis é destruída por ação do isopropanol ácido e a caixa é lida sem tampa no equipamento de quantificação. preparado com 0,04 mM de ácido clorídrico a 37% (Merck, K24620717, Alemanha) e 2-Propanol a 99,5% (Sigma, I9516, EUA). Com uma boa homogeneização, decorridos 15 minutos, a quantidade de cristais de *formazan*, diretamente proporcional ao número de células viáveis, pode ser lida por espectrofotometria. Este método ótico é um teste colorimétrico e permite quantificar a viabilidade celular através da leitura entre dois comprimentos de onda (570 e 620 nm para o MTT) [84]. Estes valores da absorvância foram determinados usando um leitor de ELISA (BioTek®, Synergy HT, EUA) acoplado a um computador PC (HP Compaq, China) com monitor (HP 1755, China) e o programa Gen5™ Biotek®.

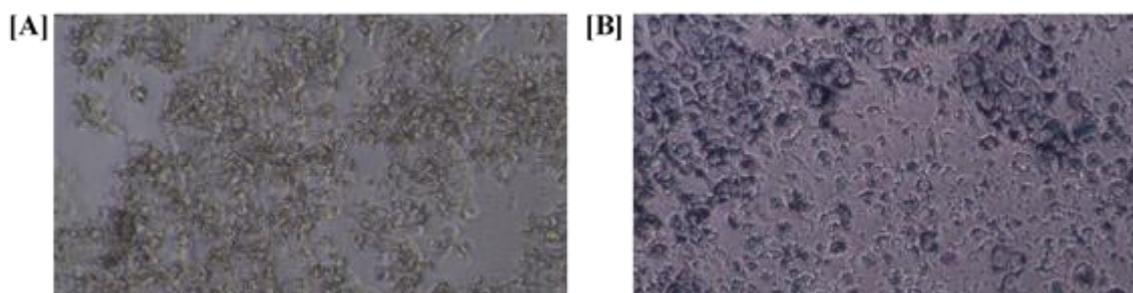


Figura 11 – Fotografias tiradas com o microscópio ótico de contraste de fase a um poço de uma caixa de cultura de 48 poços, após 3 replicações de uma solução de GTE pó: [A] antes da adição de MTT e [B] após adição de MTT. É possível notar que em [B] apenas algumas células estão coradas, mostrando que a viabilidade celular diminuiu significativamente com a adição do composto em causa.

Sendo um teste colorimétrico, foi necessário garantir que a coloração dos chás não interferia com a leitura por espectrofotometria e não influenciava os resultados obtidos através do teste do MTT. Para isso, foi efetuado um estudo em caixas celulares iguais às utilizadas nos estudos *in vitro* (página 44, Secção 3.4.3. Estudo da linha celular WiDr), com o mesmo número de aplicações (3 e 6) e o mesmo tempo de incubação (48 e 72 horas) estudados. Foi concluído, posteriormente, que a coloração não se encontra dentro dos comprimentos de onda de leitura do espectrofotómetro e, por isso, não interferia com os resultados do teste do MTT. Após esta análise, confirmou-se a fiabilidade deste teste para determinar a viabilidade celular das experiências realizadas.

### 3.5. Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* usando um modelo animal apenas se realizam caso os resultados dos estudos *in vitro* sejam favoráveis, para assim se usar o menor número de animais possível [67].

O efeito do extrato da cápsula GTEE já tinha sido estudado no mesmo modelo animal em experiências anteriores realizadas no Instituto de Biofísica [14]. Ao terem sido obtidos resultados favoráveis nos estudos *in vitro*, selecionou-se um outro extrato, o GTE em pó, para os ensaios *in vivo* seguindo um protocolo idêntico [14]. Sendo possível, pretende-se comparar os resultados obtidos com ambos os extratos.

Neste estudo *in vivo* testou-se o efeito do GTE em pó nos tumores desenvolvidos linhas celulares tumorais WiDr e MCF7, injetadas num modelo animal, O rato é uma espécie muito utilizada em laboratório para procedimentos experimentais, por exemplo nas áreas de Cirurgia, Gastroenterologia, Cardiologia, Pneumologia, estudos de biodistribuição, dadas as suas características – preço acessível, fácil manipulação, peso e tamanho apropriados, fáceis condições de manutenção em biotério, temperatura corporal e valores de bioquímica sanguínea muito semelhantes aos do ser humano, assim como a fisiologia e grande parte do código genético [70]. Uma estirpe bastante utilizada é a RNU (*Rowett Nude*), pois, sendo atímica, não desenvolve linfócitos T, essenciais para o sistema imunitário, sendo bastante utilizada em estudos de Imunologia, Doenças Infeciosas e Oncologia, entre outras. Assim, não rejeita células tumorais de outras espécies, normalmente injetadas por via subcutânea, permitindo estudar a biologia de tumores humanos em modelos animais [68].

O IBILI-FMUC possui um biotério certificado para manutenção e com autorização para a criação de algumas estirpes de rato e ratinho, com pessoal especializado no tratamento dos animais.

Os ratos foram criados e mantidos num ambiente com temperatura controlada pelo sistema de *racks* a 24°C, humidade relativa do ar mantida a 65%, ciclos de luz controlados e um mínimo de ruído. Foram mantidos em gaiolas desinfetadas (lavagem e secagem em equipamento dedicado, usando detergentes desinfetantes que não fazem espuma) com cama de carolo de milho esterilizado e brinquedos lúdicos esterilizados. As gaiolas estão colocadas em *racks* identificadas ligadas a sistemas com filtração de ar de entrada e de saída em instalações dedicadas e certificadas. A ração sólida é esterilizada, possuindo os nutrientes adequados, e a água acidificada (pH 3-4) *ad libitum* em biberões desinfetados com tetinas metálicas.

Com base no exposto, o modelo experimental animal escolhido, para induzir o desenvolvimento de tumores não ortotópicos com as linhas celulares humanas WiDr e MCF7, por uma inoculação subcutânea na região da coxa direita, foi o rato RNU (*Rowett Nude Rat*) (CrI:NIH-Foxn1<sup>tmu</sup>). Para os estudos com a linha WiDr usaram-se ratos machos de 5 meses de idade e peso médio de 295 g da mesma ninhada, por lote de experiência<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> Devido ao elevado número de células necessário para cada animal foram realizados vários lotes de animais, isto é, induziram-se tumores em várias fases, garantindo que as condições experimentais se replicavam.

Para os ensaios com a linha MCF7 usaram-se fêmeas de 4 meses de idade e peso médio 205 g da mesma ninhada, por lote de experiência.

Após a proliferação das duas linhas celulares, nas condições já mencionadas (página 34, Secção 3.2.1. Cultura celular), procedeu-se à contagem das respetivas suspensões celulares, obtidas após tripsinização dos frascos de cultura e centrifugação (página 36, Secção 3.2.2. Contagem celular). Para induzir os tumores WiDr usaram-se  $22-24 \times 10^6$  células WiDr ressuspendidas em 1 ml de DMEM completo nos ratos machos, e aproximadamente  $30-34 \times 10^6$  células MCF7 diluídas em 1 ml de DMEM completo nos ratos fêmeas.

Para as inoculações utilizou-se uma seringa de 1 ml (T Terumo® Syringe, U-100 insulina, SS+01H1, Bélgica), devidamente identificada, acoplada a uma agulha 19 G  $\times$  1'', 1.1  $\times$  25 mm (T Terumo® Neolus, NN-1925R, Bélgica), de forma a prevenir a degradação das células.

Em ambiente controlado procedeu-se à colocação do animal dentro da câmara de fluxo laminar (Heraeus Holten, HBB 2448, EUA) esterilizada com luz ultravioleta (U.V.) e limpa com Virkon (Virkon® S, 5 kg, A01576789, RU) e álcool a 75%. Para a injeção subcutânea, o animal foi posicionado em decúbito ventral e restringidos com um pano cirúrgico, pondo a descoberto a zona da coxa direita. É importante referir que este procedimento foi efetuado com cuidado extremo para não atingir a fáscia muscular (a inserção da agulha deve realizar-se com o bisel virado para a face superior) e não causar dor desnecessária ao animal. Para controlar a injeção correta retrocede-se um pouco o êmbolo da seringa e verifica-se se não entra sangue (sinal de que se puncionou inadvertidamente um vaso sanguíneo) e só depois se injeta. De seguida, identificou-se o animal para posteriores manipulações e recolocou-se na sua gaiola de origem.



Figura 12 – Inoculação subcutânea de células tumorais na região lateral da coxa direita de um rato RNU.

Como visto anteriormente (Secção 2.2.3. Linha celular MCF7), a linha celular MCF7 apenas forma tumores em modelos animais na presença de estrogénio. Assim, uma semana após a inoculação subcutânea das células tumorais MCF7, foi preparada uma suspensão de 2 mg de estradiol (Sigma, E8750, EUA) e em 1 ml de óleo de sésamo (Sigma, S3547, EUA), previamente filtrado com s filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  (dentro da câmara de fluxo laminar, utilizada para preparar as suspensões celulares, em condições de esterilidade), num *eppendorf*. Após homogeneização por vortexação (Unimag ZX3 Vortex Mixer, D-82152, Alemanha), foram retirados 0,3 ml da suspensão com uma seringa de 1 ml acoplada a uma agulha 19G  $\times$  1'', 1.1  $\times$  25 mm, igual à utilizada para indução das células tumorais, para injeção subcutânea na região dorsal dos ratos fêmeas. Este procedimento foi efetuado de acordo com as informações recolhidas da revisão bibliográfica [85].



Figura 13 – Injeção subcutânea, num rato fêmea RNU, da suspensão de estradiol em óleo de sésamo, para estimulação do crescimento da linha celular MCF7, inoculada 7 dias antes.

Neste ensaio *in vivo* foram utilizados 8 ratos macho e 8 ratos fêmea da estirpe RNU, fornecidos pelo biotério certificado do IBILI-FMUC.

Os pesos dos animais foram registados semanalmente, utilizando uma balança (Seca, modelo 734, serie 1/1, Alemanha) própria para animais. Apenas se detetou visualmente e por palpação o desenvolvimento de tumor, fez-se o registo fotográfico e medição da largura e altura, quando possível, com uma craveira (Wurth, stainless hardened, Alemanha), com a mesma periodicidade.

Após a inoculação das células, os animais foram divididos em 4 grupos assim identificados:

- *grupo 1*: animais injetados, bebendo sempre água (1 rato macho e 1 rato fêmea);
- *grupo 2*: animais injetados, bebendo posteriormente uma solução de extrato de chá verde (4 ratos macho e 4 ratos fêmea);
- *grupo 3*: animais não injetados, bebendo posteriormente uma solução de extrato de chá verde em simultâneo com o *grupo 2* (2 ratos macho e 2 ratos fêmea);
- *grupo 4*: animais não injetados, bebendo sempre água (1 ratos macho e 1 ratos fêmea).

A água foi posteriormente substituída por uma solução de GTE em pó com a preparação já referida (página 42, Secção 3.3.3: Soluções de EGCG) *ad libitum* após o tumor atingir aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.

A morte dos animais ocorreu por causas externas ao protocolo ou ocisão. A ocisão foi efetuada ou quando o tumor atingiu as proporções máximas regulamentadas (*grupo 1*) ou 1 semana depois do tumor deixar de ser mensurável e palpável. A ocisão dos animais foi através de deslocamento cervical, tendo-se cumprido todos os requisitos da legislação em vigor (Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2014, de 7 de Agosto [86]).

Aplicando o princípio dos 3 R's a este estudo (página 28, Secção 2.7. Modelo animal), em primeiro lugar, foram feitos testes *in vitro* de modo a adquirir dados orientadores para os estudos *in vivo*. O número de animais por grupo foi reduzido tendo em conta dados obtidos em estudos anteriores [14]. Todos os processos foram aperfeiçoados e estudados previamente para não tentar prevenir complicações no decorrer da experiência e não ser necessário utilizar mais animais [67].

### 3.6. Estudos histológicos

Uma semana após o tumor ter deixado de ser visível e palpável, os animais foram oicidados, como foi já mencionado, para colher amostras biológicas. Os animais foram desinfetados com iodopovina (Egrema iodopovina, 0670, Espanha) e foi efetuada uma remoção dos seus pelos, importante para a técnica histológica. Foram recolhidas amostras de sangue e urina, o tumor (*grupo 1 e grupo 2*) e de alguns órgãos relevantes como: rim, pulmão, ânus, tiróide, fígado, estômago, intestino delgado e intestino grosso, no caso dos machos (tumor de WiDr) e, no caso das fêmeas (tumor de MCF7), glândula mamária, ovário e útero, rim, pulmão, fígado e tiróide. Foi utilizado material cirúrgico Dimeda: cabo de bisturi para lâmina nº 22, tesoura e pinça de disseção, pinças de Adson de dente de rato e de prensão, pinça hemostática e lâminas de bisturi nº 22 (Kiato, carbon steel sterile surgical blades 18999108, Alemanha). Estas amostras foram fotografadas e colocadas em cassetes de fixação (PrintMate™ Embedding Cassettes, A84810048, EUA) para a realização dos estudos histológicos devidamente identificadas com lápis, sendo, por isso, colocadas de imediato em recipientes roscados com formol neutro tamponado a 10% (AppliChem Panreac, 1430091.1214, Espanha), iniciando-se a fixação.

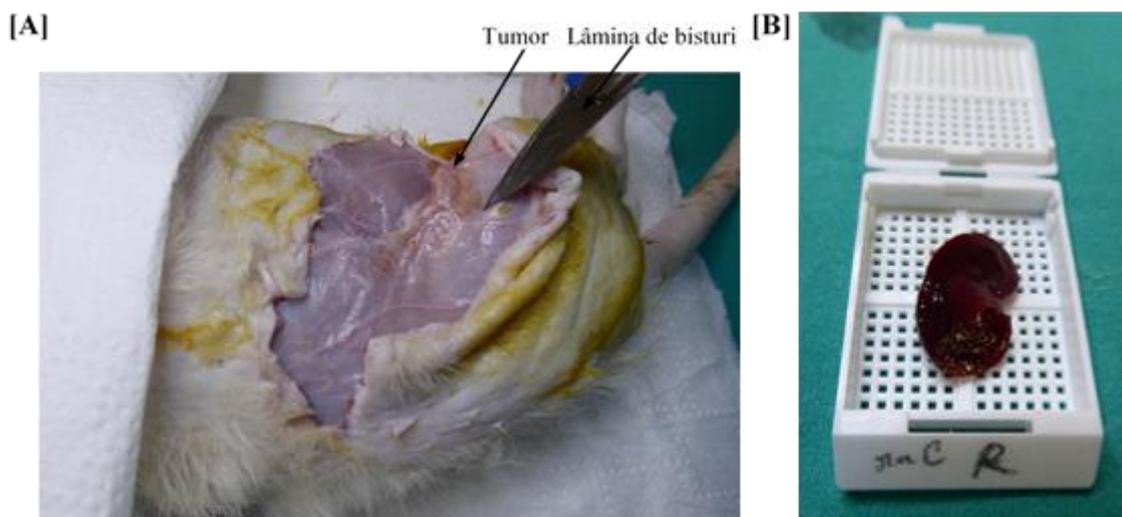


Figura 14 – Dissecção de um rato na zona de desenvolvimento do tumor para colher amostras para análise histológica: [A] restos de gordura fibrosa no local de desenvolvimento do tumor, [B] cassete de fixação utilizada com amostra de rim.

Estes recipientes foram colocados a 4°C e posteriormente entregues ao Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para análise histológica, dada a estreita colaboração existente.

A técnica histológica é o conjunto de operações que tem como principal objetivo preparar os tecidos para serem observadas por microscopia ótica. Este processo tem várias etapas que ocorrem em sequência, de acordo com os princípios fundamentais da técnica histológica. Estas etapas incluem: fixação, desidratação, diafanização, inclusão num meio sólido adequado que permita obter cortes histológicos finos (3–5 µm de espessura) para posterior coloração e observação [73], [87].

A função da fixação é impedir a alteração do tecido após a morte (ou após a colheita) e preparação para a inclusão. Este processo pode ser dividido em duas fases distintas: a coagulação ou precipitação de vários componentes do tecido e células; e a sua preservação num estado o mais próximo possível de quando estava com vida, formando compostos químicos estáveis. Um fixador substitui toda a água do material biológico e deve difundir-se completamente através dos tecidos para preservar todas as células. Neste contexto, os tecidos são geralmente cortados em pequenos fragmentos, com espessura até cerca de 3 cm, antes da fixação, para facilitar a penetração intravascular e garantir melhor a preservação do tecido. Cada uma das amostras foi fixada pelo menos durante 1 semana a 4°C e depois seccionada em duas porções [73], [87].

Foi iniciado depois o processo para análise histológica de rotina com inclusão em paraplast, uma espécie de cera que dá suporte de corte e estrutura ao tecido, e que não é miscível com a água. Assim, a preparação das amostras começou com a desidratação dos tecidos através de sucessivas soluções alcoólicas desde a solução de álcool a 70° até à concentração de 100°, realizando-se o que se designa por desidratação (Ensure, Ethanol absolute for analysis k46525683516, Alemanha). De seguida, o álcool a 100° foi substituído por um solvente orgânico miscível com o paraplast, o xilol (Sigma Aldrich, 534,056,EUA). À medida que o solvente se infiltra no tecido, este torna-se cada vez mais transparente (diafanização) (Ika Labortechnik, H5501 digital, Alemanha). De seguida, o tecido diafanizado foi transferido para o meio de inclusão, o paraplast, a 60°C dentro da estufa (Raypa, Drying oven 40°C, Espanha) durante cerca de 15-20 horas. O paraplast tem uma temperatura de fusão de 56-58°C (Sigma, P3568, EUA) e fornece à amostra a consistência

rígida necessária ao arrefecer até à temperatura ambiente, para facilitar a obtenção de cortes finos. A esta temperatura de 60°C, o solvente evapora e o tecido é preenchido pelo paraplast no estado líquido, realizando-se o que se designa de impregnação. Após esta fase, foi efetuada a inclusão nos blocos de paraplast usando um equipamento dedicado (Medite, Tes 99, Alemanha). Foi vertido paraplast para recipientes retangulares de inox (Thermo Fisher Scientific, Mini Metal Base Mold, Leica Biosystems, EUA) e foram colocados os tecidos com a ajuda de pinça de disseção aquecida aderentes ao fundo com a orientação apropriada para o corte. Os moldes são transferidos para uma zona arrefecida do aparelho para endurecem à temperatura ambiente. Os blocos endurecidos foram colocados num micrótomo (Leica, RM2155, Alemanha) e foram cortados em seções extremamente finas com 3 a 5 µm de espessura com facas descartáveis dedicadas (Kiato, Sterile Surgical blades carbon steel 188999108, Alemanha). Os blocos foram desbastados e quando se estava à profundidade correta, os cortes histológicos foram obtidos sob a forma de uma “ténia” de cortes sequenciais. Os cortes seriados selecionados são estendidos numa solução alcoólica a 30° e depois foram apanhados com uma lâmina de vidro (Knittel Glaser, Superfrost®, microscope slides K067 76×26mm, Alemanha) e transferidos para um banho termostaticado de fundo escuro (para fazer contraste com o branco do *paraplast*) a 37°C com água destilada/corrente (Tissue water bath 6951, Alemanha). Estes cortes ficam assim livres da maior parte das rugas e são transferidos para lâminas de vidro previamente revestidas com uma camada fina de cola biológica (Sigma Aldrich, P8920, EUA), identificadas e secas em racks (Medite, 0T540.340, Alemanha). De seguida, vão novamente à estufa anteriormente indicada, durante pelo menos 24 horas, para se certificar que os cortes ficaram perfeitamente amarrados à lâmina e não se descolam [72], [73], [87], [88].

A técnica de coloração dos cortes histológicos permite a definição de estruturas para observação ao microscópio ótico. O processo foi iniciado com a desparafinização: retirar o *paraplast* e substituí-lo por água, para hidratar os tecidos, uma vez que os corantes são aquosos/alcoólicos. Para isso, colocaram-se as lâminas dentro de cestos de vidro apropriados, dentro de tinas de vidro em sequência: duas delas com xilol, duas com álcool a 100°, duas com álcool a 96°, uma com álcool a 70° e outra com água destilada/corrente.

Efetuada a desparafinização, foi utilizada a técnica de coloração de hematoxilina-eosina: a hematoxilina é um corante básico que cora os componentes ácidos da célula em azul e roxo escuros, tais como o ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (RNA), corando o núcleo e regiões do citoplasma ricas em ribossomas; a eosina é um

corante ácido que cora os componentes básicos da célula em cor de rosa, tais como o citoplasma. As amostras foram coradas com hematoxilina 2% (Sigma Aldrich, MHS1, EUA), lavadas com água corrente durante 10 minutos e coradas com eosina a 1% (Sigma-Aldrich, HT110280, EUA) durante 5 minutos. Depois de coradas, passam-se as lâminas com os cortes histológicos novamente por álcool a 70° e refaz-se o percurso das tinas atrás descrito em sentido inverso, para que as lâminas desidratem e fiquem em xilol, diafanizando. Para tornar a preparação histológica definitiva, os cortes histológicos corados foram protegidos com uma lamela (RS, Cover Glass 100 PCS Thickness 0,13-0,17 mm, França) colada com uma cola sintética (Fluka, 44581, Alemanha) que só é miscível com o xilol e que tem um índice de refração semelhante ao do vidro.

Deixou-se secar na estufa de um dia para o outro e retirado o excesso de cola, as preparações foram observadas à lupa ótica (Nikon, SMZ 1500, Japão) e ao microscópio ótico (Nikon, Eclipse C600 Japão) que, por estarem acoplados a um sistema computadorizado com *software* adequado, permitiram o tratamento e registo das imagens obtidas em suporte digital [72], [73], [87].

### 3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com o objetivo de avaliar as diferenças dos valores de MTT. De forma a avaliar a eficácia dos diferentes chás e extratos de chá verde na viabilidade celular, foram efetuadas comparações ajustadas aos respetivos controlos desses mesmos testes. Todos os "valores p" foram obtidos através da utilização do programa SPSS® *Statistic*, versão 22 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA) para análise dos dados de citotoxicidade

Para analisar a influência dos diferentes parâmetros estudados, foram utilizados dois *softwares* diferentes. Inicialmente, foi utilizado o *MiniTab*, (versão 18), no entanto, como este *software* é, regra geral, adequado apenas quando há um grande volume de dados, o *software* *Statistic Data Mining*, versão 10.0 (Software Dell) foi usado para tentar confirmar os resultados previamente obtidos com o *MiniTab*.

Foi pretendido avaliar a relação entre os valores do teste do MTT e o número de células usadas, de forma a analisar se o número de células em estudo tinha influência nestes valores. Foi determinado o coeficiente de correlação de *Spearman* entre o valor de MTT e o número de células, em cada tempo de adesão (horas) e tempo de seguimento (dias). Este processo foi replicado usando o valor de MTT standardizado ao valor médio do controlo da experiência, aplicando-se, nesta situação, o coeficiente de correlação de *Pearson*. A avaliação de uma possível relação entre o número de células utilizado e o valor de MTT foi feita separadamente para as células WiDr e MCF7.

## Capítulo 4

### Resultados e Discussão

#### 4.1. Concentração de EGCG no chá e extratos de chá verde

A concentração de EGCG foi determinada utilizando a técnica da Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) nas condições e métodos descritos (página 38, Secção 3.3.1. Determinação das concentrações de EGCG no chá), injetando na coluna cromatográfica um volume de 100 µl em cada teste de todas as amostras. Foram efetuados três testes por amostra de chá e extrato de chá verde, e feito a média dos resultados de forma a obter a avaliação quantitativa da concentração de EGCG. Foram efetuado testes também com chá após exposição durante uma semana à claridade. Foi concluído que, embora a coloração do chá se altere e, conseqüentemente, a composição de alguns dos seus componentes, esta alteração não afetava a concentração do EGCG presente, visto que os resultados dos testes do HPLC foram idênticos.

A concentração de EGCG por saqueta e grama de pó em cada marca de chá estão apresentadas na Tabela 4, e a percentagem de EGCG de cada extrato de chá verde está apresentada na Tabela 5 e Tabela 6. Para além disso, os perfis cromatográficos de todas as substâncias analisadas são apresentados graficamente, tendo sido este um dos parâmetros mais importantes na decisão de quais os chás e extratos a estudar com as linhas celulares (Figura 15-Figura 27).

Tabela 4 – Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG infundida durante a preparação do chá verde de diferentes marcas.

Amostra	Peso do conteúdo por saqueta (g)	EGCG (mg) infundido no chá (200 ml) por saqueta	EGCG (mg) infundido no chá (200 ml) por grama de pó
Cem Porcento	1,8	26	14,4
Gorreana	2	25,4	12,7
Lipton	1,4	46,1	32,9
Pingo Doce	1,8	25,9	14,4
Solúvel	6	2,5	0,41
Taylors	1,5	43,5	29
Tetley Mel e Limão	1,75	31,8	18,1
Twinings	2	65,0	32,5

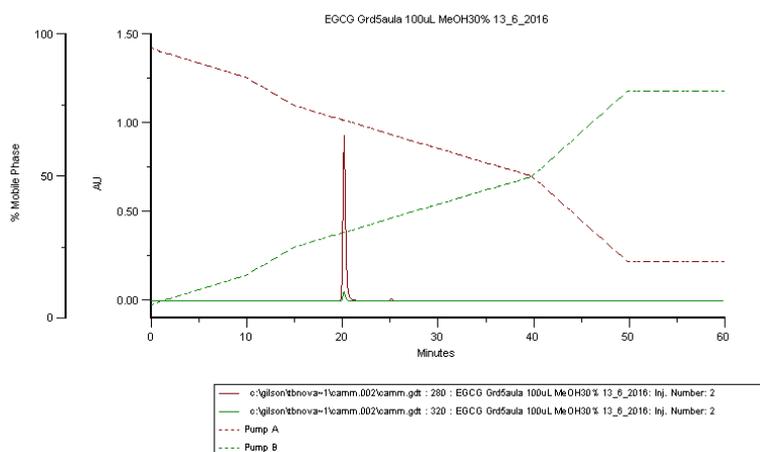


Figura 15 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do EGCG-Puro.

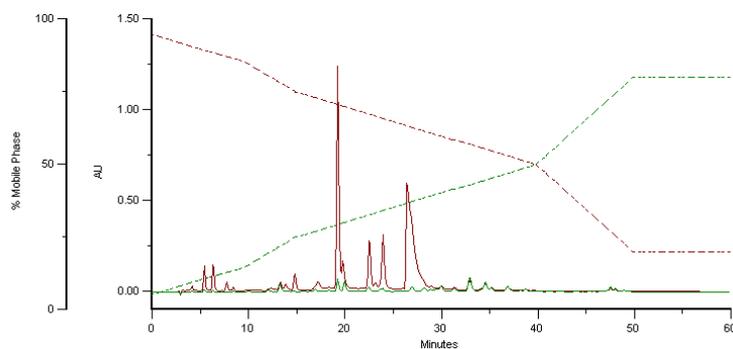


Figura 16 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Cem Porcento.

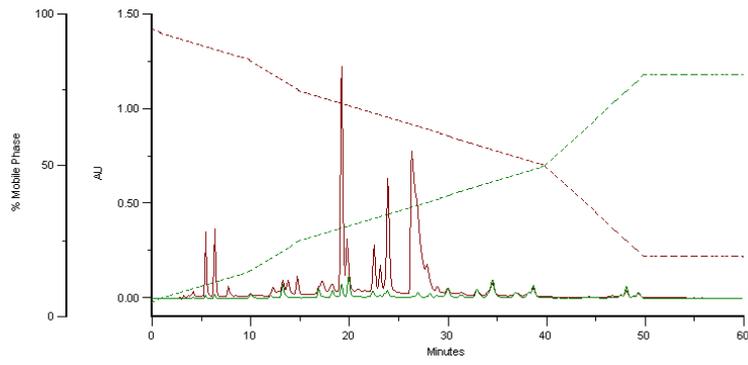


Figura 17 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Gorreana.

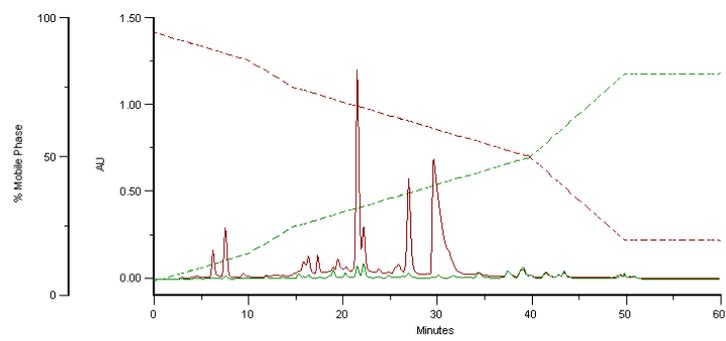


Figura 18 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Lipton.

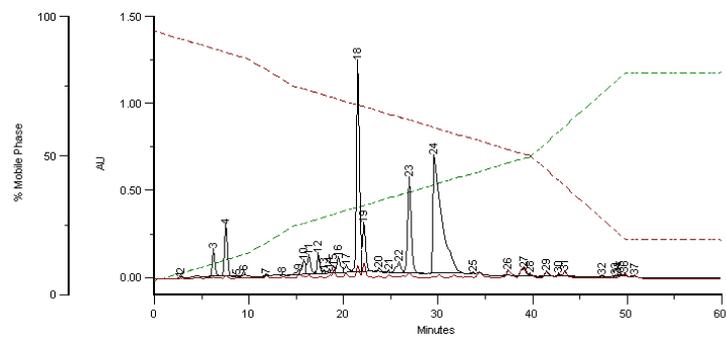


Figura 19 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Lipton, mostrando a representação por picos.

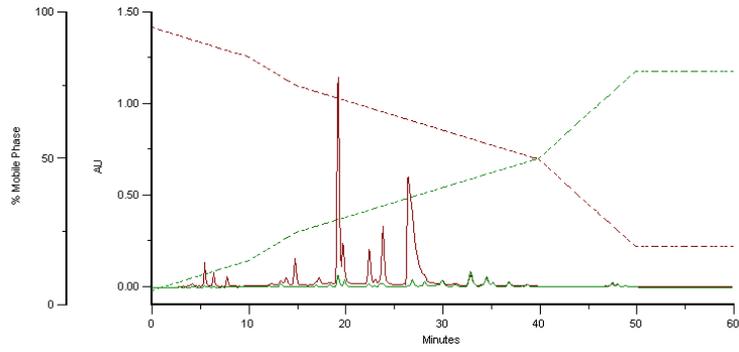


Figura 20 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Pingo Doce.

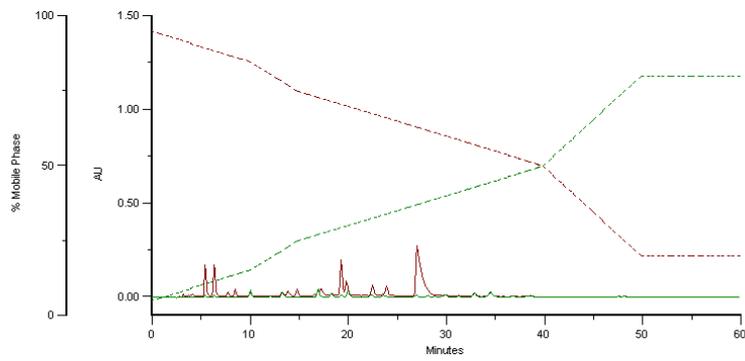


Figura 21 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Solúvel.

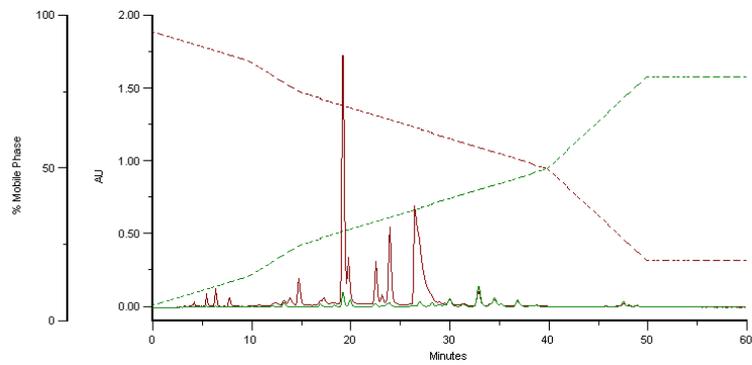


Figura 22 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Taylors.

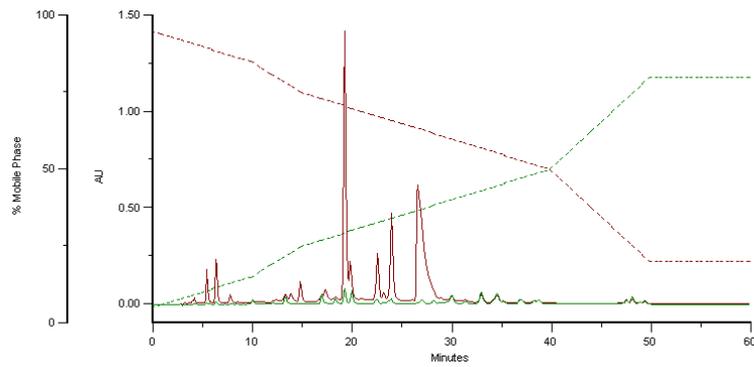


Figura 23 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Tetley Mel e Limão.

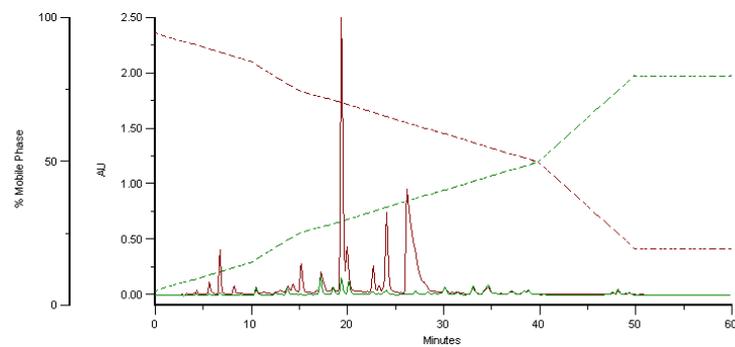


Figura 24 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do chá Twinings.

Tabela 5 – Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG infundida nos extratos de chá verde em cápsula.

Amostra	Peso do conteúdo por cápsula (mg)	EGCG (mg) por cápsula	EGCG (%) por cápsula
Mega Green Tea Extract	1200	434,47	36
Green Tea EGCG Extreme	750	403,14	54

Tabela 6 – Avaliação quantitativa da quantidade de EGCG infundida no extratos de chá verde em pó.

Amostra	Peso do conteúdo em pó (mg)	EGCG (mg) no conteúdo em pó	EGCG (%) no conteúdo em pó
Green Tea Extract	3000	203,74	7

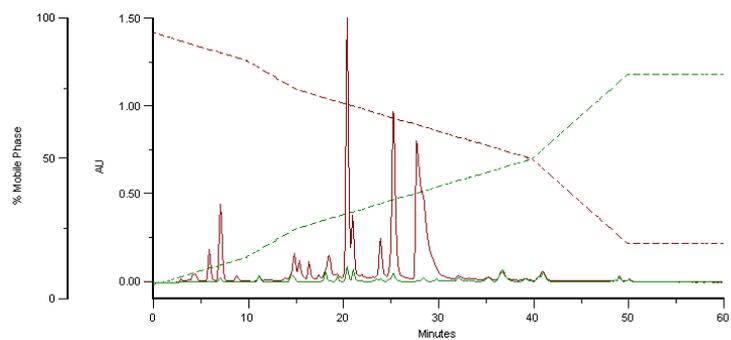


Figura 25 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do extrato de pó GTE (*Green Tea Extract*).

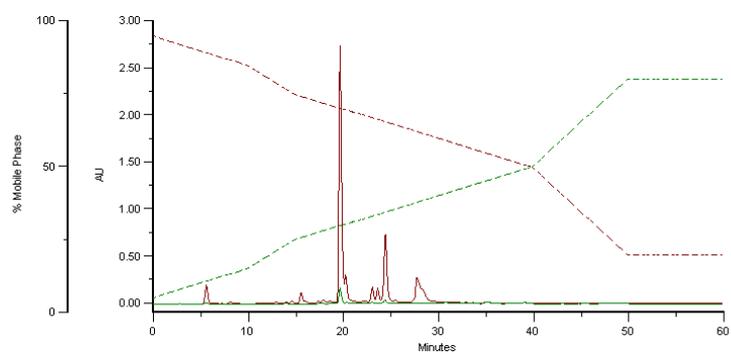


Figura 26 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do extrato de cápsula MGTE (*Mega Green Tea Extract*).

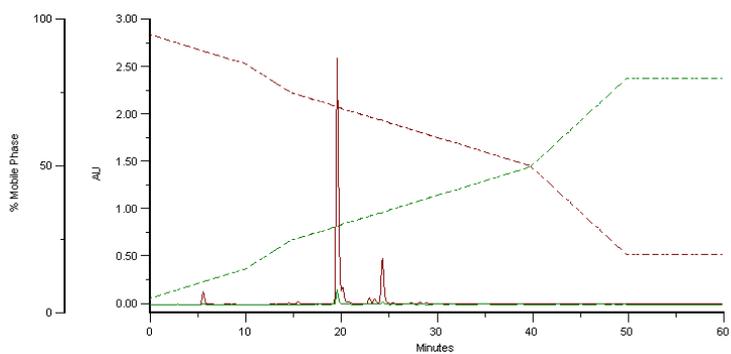


Figura 27 – Representação gráfica do espectro da técnica de HPLC do extrato de cápsula GTEE (*Green Tea EGCG Extreme*).

## 4.2. Estudos *in vitro*

### 4.2.1. Número de células

Foi pretendido avaliar a relação entre os valores do teste do MTT e o número de células usadas, de forma a analisar se o número de células em estudo tinha influência nestes valores. Foi verificado que, para ambas as linhas celulares WiDr e MCF7, os valores de MTT obtidos eram independentes do número inicial de células.

Para a linha celular WiDr, conforme se observa na Tabela 7 e na Figura 28, não existe correlação entre os valores de MTT (lidos ou standardizados) e o número de células usado inicialmente. Como  $p > 0,05$  em todos os valores de MTT, não há diferença estatisticamente significativa entre cada tempo de colagem e o número de células testados.

Tabela 7 – Tempo que a linha celular WiDr demora a aderir à superfície dos poços nas caixas de cultura e o respetivo tempo de seguimento de incubação numa incubadora apropriada.

Tempo de colagem (horas)	Tempo de seguimento (dias)	MTT		MTT Standardizado	
		Correlação	p	Correlação	p
48	0	-0,238	0,457	0,000	1,000
	3	0,361	0,118	0,153	0,521
	6	0,318	0,172	0,000	1,000
72	3	0,404	0,078	0,000	1,000
	6	0,485	0,030	0,000	1,000
96	3	0,396	0,084	0,000	1,000
	6	0,442	0,051	0,000	1,000

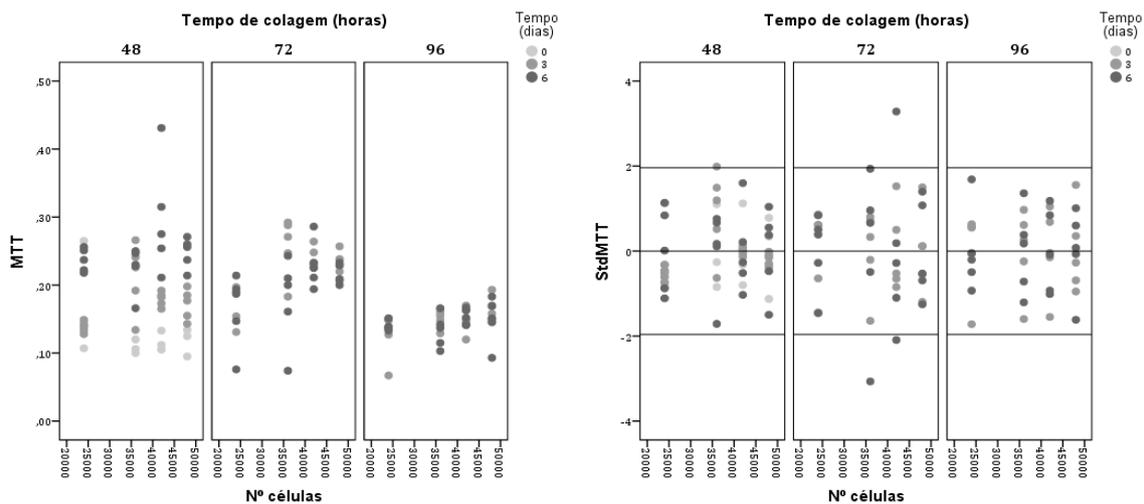


Figura 28 – Gráficos relativos à linha celular WiDr mostrando todos os tempos de colagem e os respetivos dias de seguimento, em relação ao número de células utilizado e [A] ao desvio dos valores de MTT e [B] ao desvio dos valores de MTT Standardizado (StdMTT).

Para a linha celular MCF7, conforme se observa na Tabela 8 e na Figura 29, não existe correlação entre os valores de MTT (lidos ou standardizados) e o número de células usado inicialmente, com exceção do tempo de colagem de 72 horas e com 6 dias de seguimento após a colagem, em que o valor de MTT ( $p < 0,05$ ) é tanto maior quanto maior o número de células inicialmente colado. Contudo, ao standardizar o MTT relativamente à média dessa experiência, tendo em conta a variabilidade encontrada na mesma, a correlação torna-se inexistente pelo que se pode assumir que o valor de MTT não depende do número de células inicialmente colado, até porque a correlação com o MTT apenas aparece passados 6 dias de as células terem sido coladas. De notar que existe um valor de MTT, às 72 horas de colagem, com 6 dias de seguimento, que se afasta quase 8 desvios-padrão da média dessa experiência (Figura 29 [B]).

Tabela 8 – Tempo que a linha celular MCF7 demora a aderir à superfície dos poços nas caixas de cultura e o respectivo tempo de seguimento de incubação numa incubadora apropriada.

Tempo de colagem (horas)	Tempo de seguimento (dias)	MTT		MTT Standardizado	
		Correlação	p	Correlação	p
48	3	0,361	0,118	0,153	0,521
	6	0,318	0,172	0,000	1,000
72	3	0,404	0,078	0,000	1,000
	6	0,485	0,030	0,000	1,000
96	3	0,396	0,084	0,000	1,000
	6	0,442	0,051	0,000	1,000

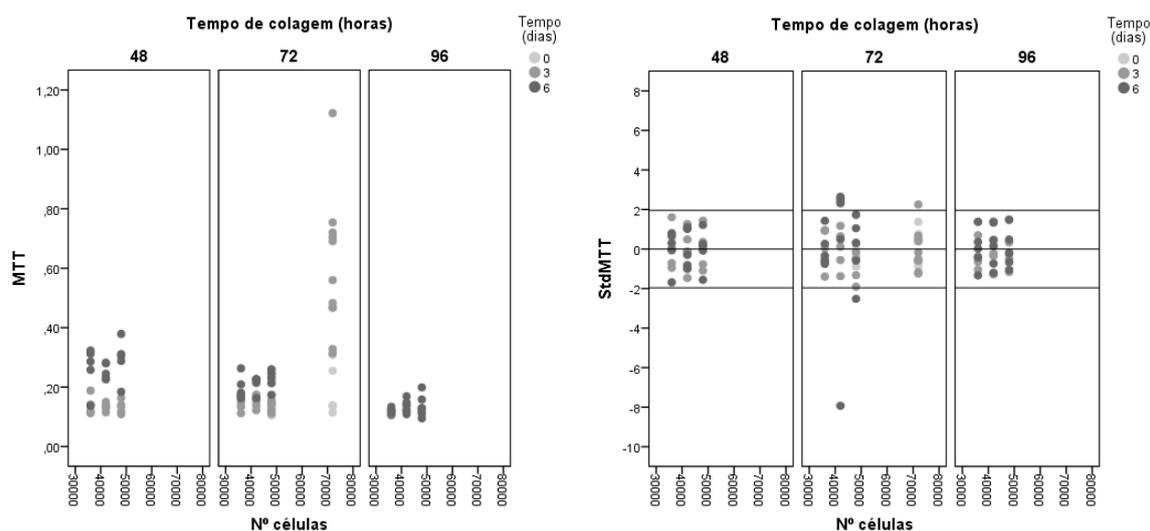


Figura 29 – Gráficos relativos à linha celular MCF7 mostrando todos os tempos de colagem e os respetivos dias de seguimento, em relação ao número de células utilizado e [A] ao desvio dos valores de MTT e [B] ao desvio dos valores de MTT Standardizado (StdMTT).

Com estes resultados, confirmou-se que os números de células estudados não têm diferença estatisticamente significativa e, por isso, os dados usados em análises futuras não têm em conta o número de células inicial.

# Referências Bibliográficas

- [1] Liga Portuguesa Contra o Cancro, «O que é o Cancro?» Disponível em: <https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [2] R. Hruban, «What are tumors and cancers», *Johns Hopkins University*, 2016. Disponível em: <https://www.jhu.edu>. [Acedido: 28-Ago-2017].
- [3] WHO, «Cancer», *WHO*, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [4] J. Ferlay *et al.*, «Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012», *Eur. J. Cancer*, vol. 49, n. 6, pp. 1374–1403, 2013.
- [5] WHO, «Data and statistics», *WHO*, 21-Ago-2017. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/data-and-statistics>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [6] WHO, «Portugal Cancer Statistics», *WHO*, 2010. Disponível em: [http://www.who.int/cancer/country-profiles/prt\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/cancer/country-profiles/prt_en.pdf?ua=1). [Acedido: 21-Ago-2017].
- [7] F. Costa, «Comparação da Incidência e Mortalidade por Cancro nos Municípios do Porto e São Paulo», Universidade do Porto, 2014.
- [8] L. C. Tapsell *et al.*, «Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future», *Med. J. Aust.*, vol. 185, n. 4 Suppl, pp. S4-24, Ago. 2006.
- [9] M. Serafini, D. Del Rio, D. N'Dri Yao, S. Bettuzzi, e I. Peluso, *Herbal Medicine*, 2.<sup>a</sup> ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2011.
- [10] N. T. Zaveri, «Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications», *Life Sci.*, vol. 78, n. 18, pp. 2073–2080, 2006.
- [11] S. Das, J. Tanwar, S. Hameed, e Z. Fatima, «Antimicrobial potential of epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a green tea polyphenol», *J. Biochem. Pharmacol. Res.*, vol. 2, n. 3, pp. 167–174, 2014.
- [12] L. Zeng, J. M. P. Holly, e C. M. Perks, «Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells», *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 5, n. MAY, pp. 1–11, 2014.
- [13] C. S. Yang, J. D. Lambert, J. Ju, G. Lu, e S. Sang, «Tea and cancer prevention: Molecular mechanisms and human relevance», *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 224, n. 3, pp. 265–273, 2007.
- [14] H. P. da Cunha, «Green Tea Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) - A Natural Agent in the Fight Against Colorectal Cancer», n. Área Científica da Farmacologia, pp. 1–77, 2016.
- [15] Registo Oncológico Regional do Norte, «Projeções de Incidência de Cancro», Porto, 2013.
- [16] B. M. Wolpin e R. J. Mayer, «Systemic Treatment of Colorectal Cancer», *Gastroenterology*, vol. 134, n. 5, pp. 1296–1310, 2008.
- [17] American Cancer Society, «Colorectal Cancer Stages». Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [18] E. T. Hawk e B. Levin, «Colorectal cancer prevention», *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, n. 2, pp. 378–391, 2005.
- [19] American Cancer Society, «Treatment of Colon Cancer by Stage». Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [20] T. R. Chen, D. Drabkowski, R. J. Hay, M. Macy, e W. Peterson, «WiDr is a

- derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29», *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 27, n. 1, pp. 125–134, 1987.
- [21] ATCC, «Product Sheet WiDr Colorectal adenocarcinoma».
- [22] P. Noguchi *et al.*, «Characterization of the WIDR: a Human Colon Carcinoma Cell Line», *In Vitro*, vol. 15, n. 6, pp. 401–8, 1979.
- [23] R. Janavičius, «Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: Implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control», *EPMA J.*, vol. 1, n. 3, pp. 397–412, 2010.
- [24] American Cancer Society, «Breast Cancer Stages». Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [25] American Cancer Society, «Breast Cancer Survival Rates Statistics». Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [26] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, e M. J. Thun, «Cancer Statistics , 2010», *A Cancer J. Clin.*, vol. 60, n. 5, pp. 277–300, 2010.
- [27] A. Y. Michaels, A. R. Keraliya, S. H. Tirumani, A. B. Shinagare, e N. H. Ramaiya, «Systemic treatment in breast cancer: a primer for radiologists», *Insights Imaging*, vol. 7, n. 1, pp. 131–144, 2016.
- [28] D. L. Holliday e V. Speirs, «Choosing the right cell line for breast cancer research», *Breast Cancer Res.*, vol. 13, p. 215, 2011.
- [29] M. B. Cirqueira, M. R. M. Moreira, L. R. Soares, e R. Freitas-Júnior, «Subtipos moleculares do câncer de mama», *Femina*, vol. 39, n. 10, pp. 499–503, 2011.
- [30] American Cancer Society, «Treatment of Breast Cancer by Stage». Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-breast-cancer-by-stage.html>. [Acedido: 21-Ago-2017].
- [31] F. Cardoso, N. Harbeck, L. Fallowfield, S. Kyriakides, e E. Senkus, «Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up», *Ann. Oncol.*, vol. 23, n. Suppl 7: vii11-vii19, 2012.
- [32] E. Andreopoulou e J. A. Sparano, «Chemotherapy in patients with anthracycline and taxane-pretreated metastatic breast cancer: An overview», *Curr. Breast Cancer Rep.*, vol. 5, n. 1, pp. 42–50, 2013.
- [33] J. Ayoub, S. Verma, e S. Verma, «Advances in the management of metastatic breast cancer: options beyond first-line chemotherapy», *Curr. Oncol.*, vol. 19, n. 2, pp. 91–105, 2012.
- [34] F. Cardoso *et al.*, «1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1)», *The Breast*, vol. 21, n. 3, pp. 242–252, 2012.
- [35] H. Roché e L. . Vahdat, «Treatment of metastatic breast cancer: Second line and beyond», *Ann. Oncol.*, vol. 22, n. 5, pp. 1000–1010, 2011.
- [36] A. Bodmer e M. Castiglione-Gertsch, «Role of hormonal manipulations in patients with hormone-sensitive metastatic breast cancer», *Eur. J. Cancer*, vol. 47, n. Suppl 3, pp. S28–S37, 2011.
- [37] R. Adão, G. De Keulenaer, A. Leite-moreira, e C. Brás-Silva, «Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção», *Rev. Port. Cardiol.*, vol. 32, n. 5, pp. 395–409, 2013.
- [38] A. Neal e P. Hoskin, *CLINICAL ONCOLOGY – Basic Principles and Practice*, 4.<sup>a</sup> ed. Hodder Arnold.
- [39] A. S. Levenson e J. V. Craig, «MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line», *Cancer Res.*, vol. 57, n. 20, pp. 3071–3078, 1997.

- [40] ATCC, «Product Sheet MCF7 Breast adenocarcinoma», 1997.
- [41] ATCC, «MCF-7 Breast adenocarcinoma Thawing, Propagating and Cryopreservation Protocol», 2012.
- [42] S. Makam N, K. N. Chidambara Murthy, C. M. Sultanpur, e R. M. Rao, «Natural molecules as tumour inhibitors: Promises and prospects», *J. Herb. Med.*, vol. 4, n. 4, pp. 175–187, 2014.
- [43] R. Kotecha, A. Takami, e J. L. Espinoza, «Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence», *Oncotarget; Adv. Online Publ. Page 2*, vol. 7, n. 32, pp. 52517–52529, 2016.
- [44] J. M. Yuan, C. Sun, e L. M. Butler, «Tea and cancer prevention: Epidemiological studies», *Pharmacol. Res.*, vol. 64, n. 2, pp. 123–135, 2011.
- [45] H. H. S. Chow e I. A. Hakim, «Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans», *Pharmacol. Res.*, vol. 64, n. 2, pp. 105–112, 2011.
- [46] D. G. Nagle, D. Ferreira, e Y. D. Zhou, «Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives», *Phytochemistry*, vol. 67, n. 17, pp. 1849–1855, 2006.
- [47] N. Khan e H. Mukhtar, «Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols», *Cancer Lett.*, vol. 269, n. 2, pp. 269–280, 2008.
- [48] Sociedade Portuguesa de Ginecologia, «Cancro Ginecológico», *Consensos Nac. 2016*, pp. 1–167, 2016.
- [49] M. Shimizu, A. Deguchi, Y. Hara, H. Moriwaki, e I. B. Weinstein, «EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 334, n. 3, pp. 947–953, 2005.
- [50] Z. P. Chen, J. B. Schell, C. T. Ho, e K. Y. Chen, «Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts», *Cancer Lett.*, vol. 129, n. 2, pp. 173–179, 1998.
- [51] R. Moreira, F. Norberto, e E. Rosa, «Quimioterapia do cancro: os agentes alquilantes .», *Quimioterapia do cancro*, pp. 25–30.
- [52] V. De Almeida, A. Leitão, L. D. C. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, e M. T. Lopes, «Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução», *Quim. Nova*, vol. 28, n. 1, pp. 118–129, 2005.
- [53] K. A. Teles, P. Medeiros-Souza, F. C. Lima, B. G. de Araújo, e R. C. Lima, «Cyclophosphamide administration routine in autoimmune rheumatic diseases: a review», *Revista Brasileira de Reumatologia*, Elsevier Editora Ltda., pp. 1–9, 2016.
- [54] «Cytosan (Cyclophosphamide): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & Uses», 2013. Disponível em: <http://www.rxlist.com/cytosan-drug.htm>. [Acedido: 13-Set-2017].
- [55] Drugs.com, «Fluorouracil Dosage Guide», 2017. Disponível em: <https://www.drugs.com/dosage/fluorouracil.html>. [Acedido: 24-Ago-2017].
- [56] Medscape, «Adrucil (fluorouracil) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more», 2017. Disponível em: <http://reference.medscape.com/drug/adrucil-fluorouracil-342092>. [Acedido: 24-Ago-2017].
- [57] S. K. Pal e J. Mortimer, «Adjuvant chemotherapy for older adults with breast cancer: making the standard a standard», *Womens. Health (Lond. Engl.)*, vol. 5, n. 5, pp. 481–484, 2009.
- [58] Drugs.com, «Capecitabine Dosage Guide», 2017. Disponível em: <https://www.drugs.com/dosage/capecitabine.html>. [Acedido: 24-Ago-2017].

- [59] C. Sessa, L. Gianni, M. Garassino, e H. van Halteren, *Clinical pharmacology of anti-cancer agents*, 1.<sup>a</sup> ed. Danvers: European Society for Medical Oncology, 2012.
- [60] Drugs.com, «Paclitaxel Dosage Guide», 2017. Disponível em: <https://www.drugs.com/dosage/paclitaxel.html>. [Acedido: 24-Ago-2017].
- [61] Drugs.com, «Docetaxel Dosage Guide», 2017. Disponível em: <https://www.drugs.com/dosage/docetaxel.html>. [Acedido: 24-Ago-2017].
- [62] Drugs.com, «Vinblastine Dosage Guide», 2017. Disponível em: [https://www.drugs.com/dosage/vinblastine.html#Usual\\_Adult\\_Dose\\_for\\_Breast\\_Cancer](https://www.drugs.com/dosage/vinblastine.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer). [Acedido: 13-Set-2017].
- [63] Drugs.com, «Doxorubicin Dosage Guide», 2017. Disponível em: [https://www.drugs.com/dosage/doxorubicin.html#Usual\\_Adult\\_Dose\\_for\\_Breast\\_Cancer](https://www.drugs.com/dosage/doxorubicin.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer). [Acedido: 24-Ago-2017].
- [64] Drugs.com, «Epirubicin Dosage Guide», 2017. Disponível em: [https://www.drugs.com/dosage/epirubicin.html#Usual\\_Adult\\_Dose\\_for\\_Breast\\_Cancer\\_\\_Adjuvant](https://www.drugs.com/dosage/epirubicin.html#Usual_Adult_Dose_for_Breast_Cancer__Adjuvant). [Acedido: 13-Set-2017].
- [65] C. Hernandez, K. Singh, e L. Ponnusamy, «Re-sensitization to Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in Drug-Resistant Breast Cancer Cells by Green Tea Polyphenol», em *Sacnas National Conference - The Diversity in STEM Conference*, 2015.
- [66] L. M. Ferreira, B. Hochman, e M. V. J. Barbosa, «Experimental Models in Research», *Acta Cirúrgica Bras.*, vol. 20, n. Supl.2, pp. 28–34, 2005.
- [67] P. Flecknell, «Replacement, reduction and refinement», *ALTEX*, vol. 19, n. 2, pp. 73–78, 2002.
- [68] C. River, «A T-cell-deficient, athymic nude model - Technical Sheet», 2009.
- [69] H. J. Schuurman, H. P. Hougén, e H. van Loveren, «The rnu (Rowett nude) and rnuN (nznu, New Zealand nude) rat: an update», *Ilar News*, vol. 34, pp. 3–12, 1992.
- [70] M. Hanes, *The Laboratory Rat*, 2.<sup>a</sup> ed. Elsevier Inc, 2006.
- [71] P. . Jones, «Rat dissection guide», *Philip Darren Jones*, 2009. Disponível em: [http://www.philipdarrenjones.com/web\\_documents/rat\\_dissection.pdf](http://www.philipdarrenjones.com/web_documents/rat_dissection.pdf).
- [72] C. Silva, «Avaliação da influência do método de esterilização na adesão e proliferação de várias linhas celulares em scaffolds de compósitos de poli(ε-caprolactona)/hidroxiapatite produzidos por uma técnica de fabricação aditiva», Universidade de Coimbra, 2016.
- [73] K. Suvarna, C. Layton, e J. Bancroft, *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7.<sup>a</sup> ed. Churchill Livingstone, 2013.
- [74] M. Arora, «Mater Methods», *Mater. Methods*, vol. 3, p. 175, Mar. 2013.
- [75] V. Silva, «Micelas poliméricas e nanopartículas de lípidos sólidos, contendo paclitaxel, para terapêutica de cancro da mama», Universidade de Coimbra, 2013.
- [76] W. Strober, «Trypan blue exclusion test of cell viability», *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Appendix 3, p. Appendix 3B, 2001.
- [77] I. De, «Câmaras de Contagem Cubetas». Disponível em: [http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlkammern\\_pt.pdf](http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_pt.pdf).
- [78] B. Câmara, «Conhecendo a Câmara de Neubauer», *Biomedicina Padrão*, 2015. Disponível em: <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/10/conhecendo-camara-de-neubauer.html>. [Acedido: 25-Ago-2017].
- [79] Sigma-Aldrich, «CryoSOfree™ DMSO-free Cryopreservation Medium». Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9249?lang=pt&region=PT>

- &gclid=Cj0KEQjw3 s6-  
BRC3kKL\_86XDvq4BEiQAAUqtZ\_8YILym3KGOaWxkzE9o2wVWk7xa7Ta4  
-p5JL1jtuoAk908P8HAQ. [Acedido: 22-Ago-2017].
- [80] R. B. Chust, «Introdução Cromatografia de Líquidos», *Bol. Soc. Port. Química*, pp. 43–54, 1990.
- [81] V. Preedy, Ed., *Tea in Health and Disease Prevention*, 1.<sup>a</sup> ed. Academic Press, 2013.
- [82] J. Qiao *et al.*, «Effect of green tea on pharmacokinetics of 5-fluorouracil in rats and pharmacodynamics in human cell lines in vitro», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, n. 6, pp. 1410–1415, 2011.
- [83] National Institutes of Health, «Drugs Approved for Breast Cancer - National Cancer Institute», 2017. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast>. [Acedido: 24-Ago-2017].
- [84] T. Bernas e J. Dobrucki, «Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes», *Cytometry*, vol. 47, n. 4, pp. 236–242, 2002.
- [85] E. Ingberg, A. Theodorsson, E. Theodorsson, e J. O. Strom, «Methods for long-term estradiol administration to mice», *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 175, n. 1, pp. 188–193, 2012.
- [86] Decreto-Lei n° 113/2013, «Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente do Ordenamento do Território», *Diário da República*, vol. 1.<sup>a</sup> série, n. 151, pp. 4709–4739, 2013.
- [87] A. Mescher, *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*, 13.<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Education, 2013.
- [88] P. F. Spitalnik, «Histological Techniques», em *Histology Laboratory Manual 2016-2017*, C. Alexander, Ed. Nove Iorque, 2016, pp. 97–103.