

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

Estudo da acção anti-tumoral do extracto de ciproquina,
isolado de *Cynara cardunculus*

Rita Isabel Ganchas Soares

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

2008

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

Estudo da acção anti-tumoral do extracto de ciprosina,
isolado de *Cynara cardunculus*

Rita Isabel Ganchas Soares

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Helder Cruz

Professor Doutor José António Belo

2008

O conteúdo da Tese de Mestrado é da exclusiva responsabilidade da autora

Rita Isabel Ganchas Soares

AGRADECIMENTOS

A escrita de uma tese exige sempre o cumprimento de inúmeras regras e conceitos. Felizmente que neste capítulo as regras podem ser quebradas e posso escrever o que me vai na alma. Tal como na ciência, os sentimentos também devem ser claros, objectivos e acima de tudo verdadeiros, por isso é com enorme satisfação que apresento os meus mais sinceros agradecimentos a várias pessoas que contribuíram com a sua confiança, apoio e conhecimento para a realização da minha Tese de Mestrado.

Em primeiro lugar agradeço ao **Professor Doutor Helder Cruz** – o principal responsável pela realização do meu Mestrado – por me facultar a oportunidade de realizar a minha tese na ECBio. Muito obrigada pelo acompanhamento e orientação, por ter confiado em mim e no meu trabalho.

Quero agradecer ao **Professor Doutor José Belo**, também orientador do meu Mestrado. Muito obrigada por toda a sua disponibilidade, apoio e enorme paciência em responder a todos os meus *e-mails*.

Muito obrigada à **Professora Doutora Maria Salomé Pais** pelo seu enorme contributo para a realização do meu Mestrado – o tão precioso extracto de cipsosina!

Quero agradecer aos membros da ECBio, **Doutor Pedro Cruz** e **Doutor Miguel Santos**, pelo apoio e interesse que depositaram no meu trabalho.

O meu agradecimento vai também para a **Comissão Coordenadora do Mestrado Integrado de Engenharia Biológica da Universidade do Algarve**, por me facultarem a oportunidade de realizar o Mestrado, enriquecendo assim o meu conhecimento científico.

Um agradecimento muito especial à minha **Verinha!** Que sempre me apoiou, me incentivou a seguir os meus sonhos e me aturou nos momentos mais difíceis! Obrigada por todas as palavras de encorajamento e conforto, mas principalmente muito obrigada pela ajuda e amizade! Desejo-te as maiores felicidades, amiga! ☺

Muito obrigada ao meu colega e amigo **Zé Paulo**, que tem uma enorme paciência para me aturar! Não é fácil trabalhar com mulheres, não é Zé?! Mas descansa, já deves ter um lugar bem especial no céu à tua espera! ☺ Obrigada pelo apoio, interesse que sempre demonstraste pelo meu trabalho, companheirismo e amizade ao longo desta vida de “ECBianos”! Sê feliz!

Quero também agradecer à minha colega e amiga **Inês**! Finalmente já acabaram os longos serões em que ficávamos as duas a escrever as nossas teses! Muito obrigada por toda a tua amizade, espírito de entreatajuda e boa disposição que trouxeram alegria ao trabalho, mesmo nos momentos mais difíceis! Desejo-te as maiores felicidades e que a tua estrelinha da sorte “verde lima” continue sempre a brilhar!

Muito obrigada ao meu “vizinho” de laboratório, o **Telmo**, por me ter informado, há uns tempos atrás, do Mestrado Integrado da nossa Universidade do Algarve! Obrigada pela tão importante informação, amizade e companheirismo!

Um agradecimento muito especial aos meus **Pais**! A quem devo a vida e tudo o que hoje sou. Muito obrigada por todo o vosso amor e apoio inestimáveis, por me terem ensinado que com força e determinação alcançamos as maiores e mais importantes metas da nossa vida!

Muito obrigada à minha cientista preferida, a **Doutora Sandra**, a minha irmã!! Que sempre me apoiou e me incentivou a voar em busca dos meus sonhos! Acima de tudo obrigada por toda a tua amizade, carinho, sabedoria e ajuda de hoje, amanhã e sempre! Desejo-te a maior felicidade do Universo!

Muito obrigada ao **João**, por todo o apoio inesgotável! Obrigada por me compreenderes tão bem, por toda a paciência que tiveste para me aturar durante esta fase mais atribulada da minha vida! Obrigada por compreenderes tão bem os longos serões e inúmeros fins-de-semana em que fiquei embrenhada na escrita da minha tese! Obrigada pelas palavras de encorajamento e carinho com que sempre me brindaste! Obrigada por me fazeres acreditar nas minhas potencialidades e por estares sempre ao meu lado!

Muitos outros houve que de alguma forma contribuíram para a realização da minha Tese de Mestrado, a todos vocês amigos, colegas e conhecidos que não mencionei, o meu sincero Muito Obrigada!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
bp	Pares de base
CatD	Catepsina D
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cm	Centrímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Meio basal <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Factor de Crescimento Epidérmico
EMEM	Meio basal <i>Minimum Essential Medium Eagle with Earle's Balanced Salt Solution</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
FHs74 Int	Linha celular epitelial de intestino humano
g	Gramma
h	Horas
HCT116	Linha celular epitelial derivada de carcinoma cólon-rectal
Hela	Linha celular epitelial derivada de adenocarcinoma do colo do útero
HT1080	Linha celular epitelial derivada de fibrossarcoma
IC ₅₀	Concentração de composto citotóxico, à qual se verifica uma redução de 50% de crescimento e viabilidade celulares.
kDa	Quilodalton
L	Litro
Log	Logaritmo
M	Molar (1 mol/L)
mA	Miliampere
mL	Mililitro (10 ⁻³ L)
mM	Milimolar (10 ⁻³ M)
m/v	Massa/Volume
NEAA	Aminoácidos não essenciais
nm	Nanómetro
NR	Vermelho Neutro
PSI	<i>Plant Specific Insert</i>
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio – Electroforese em gel de poliacrilamida
SRB	Sulforrodamina B
SRB _B	Média da absorvância dos ensaios branco
SRB _C	Média da absorvância dos ensaios controlo
SRB _T	Absorvância de cada replicado para cada concentração do agente potencialmente citotóxico

td	Tempo de duplicação
TE	Tampão Trishidroximetilaminometano – Ácido Etilenodiaminotetraacético
TE671	Linha celular fibroblástica derivada de rhabdomyosarcoma
T ₂₅	Suporte de cultura (<i>T-flask</i>) de 25 cm ² de área de cultura
U	Unidades
V	Volt
Vero	Linha celular epitelial de rim de macaco verde africano
v/v	Volume/Volume
μ	Taxa específica de crescimento
μg	Micrograma (10 ⁻⁶ g)
μm	Micrómetro (10 ⁻⁶ m)
μL	Microlitro (10 ⁻⁶ L)
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
Cu ²⁺	Íon de cobre divalente
Cu ⁺	Íon de cobre monovalente

RESUMO

A ciência tem sugerido inúmeras estratégias para o combate ao cancro. O desenvolvimento de terapias recorrendo a compostos isolados de plantas surge como um método de tratamento cujo conhecimento não está totalmente explorado, mas representa um campo promissor para a medicina.

O presente trabalho teve como objectivo avaliar o potencial anti-tumoral do extracto de ciprosina, extraído da planta do cardo, *Cynara cardunculus*.

A actividade anti-tumoral foi testada em linhas celulares tumorais humanas derivadas de: carcinoma (HCT116), fibrossarcoma (HT1080), rabdomiossarcoma (TE671) e adenocarcinoma (Hela), assim como em linhas celulares não tumorais epiteliais, de intestino humano (FHs74 Int) e de rim de macaco verde africano (Vero).

Os resultados permitiram verificar que o método de Sulforrodamina B (SRB) é o mais adequado para o estudo da citotoxicidade do extracto de ciprosina, sendo o seu grau de citotoxicidade avaliado de acordo com o parâmetro IC_{50} .

Verificou-se que o extracto de ciprosina a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provocou a lise da maioria da população de todas as linhas celulares estudadas, e que o extracto à concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provocou alterações morfológicas em todas as linhas tumorais, apresentando as células sinais de lise, enquanto que nas linhas celulares não tumorais não se verificaram alterações significativas na morfologia nem no crescimento celular.

Verificou-se que o extracto de ciprosina apresenta uma citotoxicidade mais acentuada nas linhas tumorais, sendo a linha celular HCT116 a mais sensível. Esta linha celular (IC_{50} de HCT116 = 38.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) é três a dezasseis vezes mais sensível que as linhas celulares não tumorais, respectivamente FHs74 Int (IC_{50} = 118.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Vero (617.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

O potencial anti-tumoral do extracto de ciprosina manifestou-se pela sua capacidade de induzir alterações morfológicas, inibir o crescimento celular e induzir morte celular. O extracto de ciprosina à concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aparenta estar na base de uma terapia anti-tumoral, mais especificamente a terapia do cancro do cólon.

Palavras-chave: Cancro, cardo, *Cynara cardunculus*, ciprosina, anti-tumoral, citotoxicidade, vermelho neutro, sulforrodamina B, parâmetro IC_{50} .

ABSTRACT

Many strategies have emerged in science to combat cancer. The development of new therapies, using compounds isolated from plants, is a method of treatment not yet fully exploited, but represents a promising field for medicine.

The present study aimed to evaluate the anti-tumoral potential of the cyprosin extract, from the cardoon plant, *Cynara cardunculus*.

The anti-tumoral activity of this extract was tested in human tumor cell lines derived from: carcinoma (HCT116), fibrosarcoma (HT1080), rhabdomyosarcoma (TE671) and adenocarcinoma (Hela), as well as in non-tumor cell lines derived from: human epithelial intestine (FHs74 Int) and African green monkey epithelial kidney (Vero).

The results suggest that the method of Sulphorhodamin B (SRB) is the most suitable for studying the cytotoxicity of the cyprosin extract, evaluated according to the IC_{50} parameter.

It was proved that the cyprosin extract at 1000 $\mu\text{g/mL}$ caused cell lysis in the majority of the cell lines studied. At 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration the extract caused morphological changes in all tumor cell lines, with the cells showing signs of lysis, whereas the non-tumor cell lines did not show any significant changes in morphology or in cell growth.

It was also found that the cyprosin extract presents a greater cytotoxic effect on tumor cells than observed on the other studied cell lines, moreover HCT116 cell line seems to be the most sensitive. This cell line (IC_{50} of HCT116 = 38.6 $\mu\text{g/mL}$) is three to sixteen times more sensitive in comparison to the non-tumoral cell lines, respectively FHs74 Int (IC_{50} = 118.5 $\mu\text{g/mL}$) and Vero (IC_{50} = 617.8 $\mu\text{g/mL}$).

The anti-tumor potential of the cyprosin extract (below 100 $\mu\text{g/mL}$) is revealed by its ability to induce morphological changes, to inhibit cell growth of tumor derived cells and to induce cellular death.

Therefore, the use of cyprosin extract may be a promising basis of anti-tumor therapy in a near future, more specifically for the treatment of colon cancer.

Keywords: Cancer, cardoon, *Cynara cardunculus*, cyprosin, anti-tumoral, cytotoxicity, neutral red, sulphorhodamin B, IC_{50} parameter.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Terapia anti-tumoral	1
1.2. Terapia anti-tumoral recorrendo a compostos de origem vegetal	2
1.3. Planta do cardo	4
1.4. Proteinases	4
1.4.1. Proteinases aspárticas	5
1.4.1.1. Proteinases aspárticas de origem vegetal	6
1.5. Ciproquina	7
2. Objectivo	9
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Material Biológico	10
3.2. Métodos	11
3.2.1. Desenho experimental	11
3.2.2. Isolamento e purificação do extracto de ciproquina	11
3.2.3. Caracterização do extracto de ciproquina purificado por SDS-PAGE	12
3.2.4. Caracterização de linhas celulares	12
3.2.4.1. Necessidades nutricionais das linhas celulares	13
3.2.4.2. Crescimento celular das linhas celulares tumorais e não tumorais	13
3.2.5. Cultura celular	14
3.2.6. Método de quantificação de proteína total	14
3.2.7. Inoculação das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes densidades de inóculo	15
3.2.7.1. Ensaio de citotoxicidade	16
3.2.7.2. Método do Vermelho Neutro com o agente citotóxico Paclitaxel	16
3.2.7.2.1. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações de paclitaxel	17
3.2.7.2.1. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais	17
3.2.7.2.3. Medição da incorporação do corante NR	17
3.2.7.3. Método Sulforrodamina B com o agente citotóxico Paclitaxel	18

3.2.7.3.1. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações do paclitaxel	18
3.2.7.3.2. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais	18
3.2.7.3.3. Quantificação colorimétrica da proteína celular	19
3.2.7.4. Avaliação da citotoxicidade do tampão Tris-EDTA	20
3.2.7.4.1. Inoculação das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes densidades de inóculo	20
3.2.7.4.2. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações do tampão TE	20
3.2.7.4.3. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais	21
3.2.7.4.4. Quantificação colorimétrica através do método SRB	21
3.2.7.5. Avaliação da citotoxicidade do extracto de ciprosina	22
3.2.7.5.1. Inoculação das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes densidades de inóculo	22
3.2.7.5.2. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações do extracto de ciprosina	22
3.2.7.5.3. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais	23
3.2.7.5.4. Quantificação colorimétrica através do método SRB	23
3.2.8. Registo fotográfico	23
4. Resultados	24
4.1. Caracterização do extracto de ciprosina purificado por SDS-PAGE	24
4.2. Caracterização do crescimento celular	24
4.3. Ensaio de citotoxicidade	29
4.3.1. Avaliação do efeito citotóxico do paclitaxel	30
4.3.1.1. Linha celular tumoral HCT116	30
4.3.1.2. Linha celular tumoral HT1080	32
4.3.1.3. Linha celular tumoral TE671	34
4.3.1.4. Linha celular tumoral Hela	36
4.3.1.5. Linha celular não tumoral Vero	37
4.3.1.6. Linha celular não tumoral FHs74 Int	38
4.3.2. Sulforrodamina B	42

4.3.2.1. Avaliação do efeito citotóxico do tampão Tris-EDTA	42
4.3.2.1.1. Avaliação microscópica do efeito citotóxico do tampão Tris-EDTA	42
4.3.2.1.2. Avaliação espectrofotométrica do efeito citotóxico do tampão TE	44
4.3.2.2. Avaliação do efeito citotóxico do extracto de ciprosona	46
4.3.2.2.1. Avaliação microscópica do efeito citotóxico do extracto ciprosona em tampão TE	46
4.3.2.2.2. Avaliação espectrofotométrica do efeito citotóxico do extracto de ciprosona	50
5. Discussão	53
6. Conclusões e Perspectivas futuras	59
7. Referências bibliográficas	61
8. Páginas de Internet de bases de dados	68

ANEXOS

ANEXO I – SOLUÇÕES E REAGENTES

ANEXO II – TÉCNICAS

ANEXO III – VALORES DE ABSORVÂNCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do desenho experimental realizado no estudo das propriedades anti-tumorais do extracto de ciprosina.	11
Figura 2 – Fotografia do gel de SDS-PAGE.	24
Figura 3 – Morfologia das linhas celulares estudadas em sistema de cultura estática.	25
Figura 4 – Representação gráfica da cinética de crescimento em sistema de cultura estática, das linhas celulares tumorais e não tumorais.	26
Figura 5 – Representação gráfica da recta de regressão linear da concentração celular em função do integral cumulativo da concentração de células totais viáveis ao longo do tempo, correspondente ao crescimento exponencial.	29
Figura 6 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral HCT116.	30
Figura 7 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, para a linha celular tumoral HCT116.	31
Figura 8 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral HT1080.	32
Figura 9 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, para a linha celular tumoral HT1080.	33
Figura 10 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral TE671.	34
Figura 11 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, para a linha celular tumoral TE671.	35
Figura 12 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral Hela.	36
Figura 13 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, para a linha celular tumoral Hela.	37

Figura 14 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular não tumoral Vero.	38
Figura 15 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, para a linha celular não tumoral Vero.	39
Figura 16 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular não tumoral FHs74 Int.	40
Figura 17 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, para a linha celular não tumoral FHs74 Int.	41
Figura 18 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição à concentração mais elevada do tampão TE (36 mM e 0,7 mM de EDTA).	42
Figura 19 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida ao extracto de ciprosina à concentração de 1000 µg/mL.	46
Figura 20 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida ao extracto de ciprosina à concentração de 100 µg/mL.	48
Figura 21 – Representação gráfica da Função <i>Hill</i> .	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Exemplos de compostos naturais utilizados na terapia anti-tumoral, isolados a partir de determinadas espécies de plantas.	3
Tabela II – Linhas celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade.	10
Tabela III – Densidades de inóculo (Células/cm ²) das linhas celulares inoculadas para os ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade NR e SRB.	16
Tabela V – Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) das linhas celulares tumorais e não tumorais utilizadas.	29
Tabela VI – Valores do parâmetro IC ₅₀ , que traduzem a concentração do extracto de ciprosona, que inibe em 50% a proliferação celular tumoral e não tumoral.	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia anti-tumoral

Os mecanismos de proliferação celular, durante os quais as células aumentam a sua biomassa, duplicando os cromossomas e dividindo-se de modo a originar células geneticamente iguais, desenvolvem-se de forma constante e controlada, de acordo com as necessidades gerais do organismo (Andreeff *et al.*, 2000).

Sob condições normais, durante a proliferação celular são produzidas proteínas envolvidas no crescimento, utilizadas para estimular a propagação normal das células. Quando é atingido o número suficiente de células, estas fazem uso de inibidores de factores de crescimento, que regulam proteínas inibidoras do crescimento celular. Deste modo, a proliferação celular normal é controlada pela produção coordenada e equilibrada de factores e de inibidores de factores de crescimento (Azevedo, 1999).

No entanto, este equilíbrio pode ser alterado, mediante uma mutação genética, conduzindo a uma propagação celular descontrolada, característica das células cancerosas.

O cancro surge como uma consequência da desregulação do ciclo celular, o que resulta numa perda progressiva da diferenciação celular e num crescimento celular descontrolado. A génese deste fenómeno é multifactorial, nomeadamente alimentação, consumo de álcool, drogas, factores ambientais como poluição, compostos químicos, radiação ionizante, factores genéticos e hereditários, podem conduzir a um crescimento tumoral (Dervan, 1999).

O crescimento tumoral é um processo multifásico que conduz a uma série de mutações cromossómicas que progressivamente convertem as células normais a um estado pré-canceroso e finalmente a um estado canceroso. Consequentemente, formam-se tumores que, ao se desenvolverem, tornam-se intracelularmente desorganizados até adquirirem o fenótipo maligno. São as propriedades malignas do cancro que o diferencia dos tumores benignos (Goldsby *et al.*, 2002).

Um tumor de crescimento limitado e desprovido da capacidade de invadir os tecidos adjacentes, é denominado de tumor benigno, enquanto o tumor maligno, para o qual se utiliza especificamente o termo cancro, tem a capacidade de crescer continuamente, invadir e metastizar diferentes locais do organismo, tornando-se progressivamente invasivo (Goldsby *et al.*, 2002).

Durante o processo de metastização, as células cancerosas invadem a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, sendo transportadas para outros tecidos, onde continuam a sua proliferação (Goldsby *et al.*, 2002).

Os tumores malignos são classificados segundo a origem embrionária do tecido, a partir do qual o tumor derivou. Diferentes tipos de cancro, nomeadamente do cólon, mama, próstata e pulmões são carcinomas, os quais se formam em tecidos endodermis ou ectodermis, como a pele. Os sarcomas são outro tipo de tumor, que se originam

frequentemente a partir de tecidos conectivos mesodermiais, como ossos, músculos e cartilagem (Goldsby *et al.*, 2002).

Os constantes avanços na medicina e na investigação científica têm sugerido diversas estratégias para a inibição da progressão do crescimento tumoral, nomeadamente (1) remoção de tumores por cirurgia; (2) exposição do organismo a radiação de raios X ou gama; (3) quimioterapia, caracterizada pela administração de fármacos com a capacidade de inibir a proliferação celular ou induzir a morte celular por apoptose das células tumorais; (4) estimulação do sistema imunológico contra as células cancerígenas, por administração de vacinas compostas por células cancerosas atenuadas, células cancerosas lisadas ou receptores cancerosos purificados. Esta terapia inclui também a administração de anticorpos que reconhecem de forma específica os receptores de células cancerosas; (5) terapia genética, caracterizada pela inserção de genes funcionais (transgenes) em células com genes defeituosos, conferindo um efeito terapêutico directo (Carvalho *et al.*, 2005).

De todas as estratégias de terapia do cancro, a quimioterapia é o método mais correntemente utilizado, que tem a desvantagem de a toxicidade do fármaco afectar as células cancerosas e as células normais.

No sentido de minimizar as lesões das células não tumorais têm sido desenvolvidos vários estudos, entre os quais se destacam experiências com várias espécies de plantas de elevado valor terapêutico, das quais são isoladas diferentes substâncias químicas usadas como drogas anti-tumorais.

1.2. Terapia anti-tumoral recorrendo a compostos de origem vegetal

A medicina natural tem sido utilizada para o tratamento de diversas patologias, sendo os extractos de plantas, desde há muito tempo, considerados como uma importante fonte de novos fármacos. Como resultado muitos compostos utilizados na medicina moderna actual são extraídos de plantas (Lee, 2000).

Ao contrário dos fármacos extraídos de bactérias e fungos, os compostos extraídos de plantas (Tabela I) com actividade anti-tumoral não interferem com o mecanismo de síntese dos ácidos nucleicos.

Tabela I – Exemplos de compostos naturais utilizados na terapia anti-tumoral, isolados a partir de determinadas espécies de plantas (Pettit *et al.*, 1994).

Planta (Espécie)	Composto isolado
<i>Betula alba</i>	Ácido betulínico
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina
<i>Cannabis sativa</i>	Δ -9-tetrahydrocannabinol
<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastina
<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicina
<i>Nothapodytes foetida</i>	Acetilcamptotecina
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofilotoxina
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	β -lapacone
<i>Taxus baccata</i>	Docetaxel
<i>Taxus brevifolia</i>	Paclitaxel

Dos compostos apresentados na Tabela I destaca-se o paclitaxel, composto isolado da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), que surge como uma importante ferramenta no tratamento de diferentes tipos de cancro, nomeadamente cancro do pulmão, ovário, mama e sarcoma de *Kaposi* (Wani *et al.*, 1971).

As células cancerosas possuem um rápido crescimento celular devido à sua extensa capacidade de reconstrução do citoesqueleto. Deste modo, o paclitaxel ao ser utilizado no tratamento do cancro impede a constante reconstrução do citoesqueleto das células cancerosas, impedindo-as de utilizar o seu citoesqueleto de uma forma flexível (Peltier *et al.*, 2006).

O paclitaxel liga-se a determinadas proteínas como a tubulina, fixando a estrutura dos microtúbulos, impedindo o normal funcionamento da chamada instabilidade dinâmica, caracterizada pelo constante encurtamento e alongamento dos microtúbulos, necessários ao mecanismo de transporte dos componentes celulares. Deste modo, o paclitaxel provoca danos em todas as fases do ciclo celular, impedindo assim a proliferação das células cancerosas (Funchs *et al.*, 1978).

O uso do paclitaxel é um tratamento eficaz para diversos tipos de cancro, mas afecta de modo adverso o processo de divisão celular, quer das células cancerosas, quer das células normais. Nesse sentido, é de elevado interesse para a medicina a introdução de extractos naturais em fármacos, cuja aplicação terapêutica não seja muito agressiva.

Diversas plantas, algumas presentes na produção de produtos alimentares, possuem propriedades terapêuticas através de diferentes mecanismos de anti-oxidação, anti-mutagénese, modelação enzimática, expressão genética e apoptose (Miadokova *et al.*, 2008).

1.3. Planta do cardo

A planta do cardo (*Cynara cardunculus*, Linnaeus 1753) é o exemplo de uma planta com um elevado potencial anti-oxidante, constituída por flavonóides e saponinas (Miadokova *et al.*, 2008 e Valentão *et al.*, 2002).

O cardo é uma espécie perene da família *Asteraceae*, endémica em Portugal Continental e nos Arquipélagos da Madeira e das Canárias, podendo também ser encontrada nas zonas a Sul e a Oeste da região Mediterrânica e no Norte de África (Cordeiro *et al.*, 1994).

A planta do cardo é vulgarmente utilizada em Portugal como agente coagulante do leite, na produção tradicional de queijo, devido à actividade proteolítica dos seus enzimas constituintes, denominados de peptidases, proteases ou proteinases.

Recentes estudos têm revelado que as proteinases constituintes da planta do cardo, para além da sua importância a nível alimentar, possuem também um elevado potencial terapêutico (Romanova *et al.*, 2001).

Na medicina natural, o cardo é utilizado no tratamento de insuficiência hepática, devido às suas propriedades coleréticas, ao contribuir para o aumento da segregação de bilis pelo fígado, descongestionando-o e facilitando a digestão (Miadokova *et al.*, 2008).

Resultados cientificamente comprovados demonstraram que a planta do cardo possui propriedades hipocolesterolémicas, ao diminuir os níveis de colesterol hepático, diminuindo assim a deposição de gorduras nas vias sanguíneas (Križková *et al.*, 2004). Vários compostos farmacêuticos utilizados no tratamento por quimioterapia contêm também na sua composição extractos de cardo, uma vez que a planta contribui para a regulação dos níveis de substâncias químicas presentes no fígado (Miadokova *et al.*, 2008).

Alguns autores têm mesmo revelado a importância dos bioflavonóides da planta do cardo como produtos naturais de elevado potencial anti-mutagénico, anti-oxidante e anti-inflamatório (Miadokova *et al.*, 2008; Romanova *et al.*, 2001; Križková *et al.*, 2004).

No passado, a informação bibliográfica disponível demonstrou-nos que a planta do cardo possui uma elevada importância a nível alimentar, mas actualmente resultados científicos revelam-nos que a planta possui também um papel promissor na medicina, na medida em que é constituída por proteinases de elevado valor terapêutico.

1.4. Proteinases

As proteinases, também designadas por proteases, peptidases ou enzimas proteolíticos, são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos, num processo denominado por clivagem proteolítica, caracterizado como um mecanismo comum de activação ou inactivação de enzimas.

De acordo com a posição da ligação dos aminoácidos a ser clivada na cadeia polipeptídica, as proteinases são classificadas por exopeptidases ou endopeptidases.

As exopeptidases actuam somente na extremidade da cadeia peptídica na região amínica (N-terminal) ou carboxílica (C-terminal), sendo designadas respectivamente por aminopeptidases e carboxipeptidases (Rao *et al.*, 1998)

As endopeptidases actuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as extremidades N- e C- terminal. Segundo alguns autores, as endopeptidases desempenham um papel fundamental na transmissão de sinais bioquímicos essenciais para o correcto funcionamento da apoptose (Rawlings e Barret, 1995; Beers *et al.*, 2000).

A morte celular programada, também designada por apoptose, é um processo fundamental no desenvolvimento de organismos multicelulares, na regulação e manutenção de populações de células em tecidos, sob condições fisiológicas e patológicas. De um modo geral, o processo de apoptose tem uma elevada importância biológica, ao estar envolvido em processos de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, homeostasia e regulação do sistema imunitário (Leist *et al.*, 2001).

Qualquer disfunção ou desregulação do processo apoptótico pode conduzir a uma variedade de condições patológicas, nomeadamente *alzheimer*, cancro, doenças auto-imunes e disseminação de infecções virais (Fadeel *et al.*, 1999).

Nesse sentido, rapidamente se despertou o interesse no estudo de endopeptidases, essenciais ao funcionamento normal do processo de apoptose, as quais segundo os seus mecanismos catalíticos são subdivididas em serina-proteinases, cisteína-proteinases, metalo-proteinases e proteinases aspárticas.

1.4.1. Proteinases aspárticas

As proteinases aspárticas estão presentes em vertebrados, plantas, nemátodos, leveduras, fungos, bactérias e vírus, e desempenham uma função importante na maturação proteica, assim como na degradação de proteínas durante a manutenção celular e a reestruturação de tecidos (Mutlu e Gal, 1999).

De acordo com a base de dados MEROPS criada por Rawlings e Barrett, existem 14 classes de proteinases aspárticas, cuja classificação se baseia na sequência dos aminoácidos constituintes, na sua estrutura tridimensional, nos seus mecanismos de acção e na sua sensibilidade para a actividade de inibidores específicos (Mutlu *et al.*, 1999; Simões e Faro, 2004; Rawlings e Morton, 2006).

Em 1996, Deiss e colaboradores, através de uma estratégia de silenciamento de genes que visava a identificação de genes responsáveis pelo mecanismo de morte celular programada, verificaram que o RNA antisense de uma proteinase aspártica humana, a

Catepsina D (CatD) controlava a propagação celular de uma linha epitelial humana derivada de um adenocarcinoma, através da regulação e controlo do processo de apoptose.

Este estudo foi o primeiro de muitos outros, sobre a importância desta proteinase no processo apoptótico. Desde então outros mecanismos têm vindo a ser propostos para explicar a função da CatD na indução da apoptose. Piwnica e colaboradores (2004) mostraram que a CatD é provida da capacidade de processar a prolactina humana em pequenos fragmentos semelhantes ao seu próprio N-terminal, que exercem uma acção inibitória na progressão de tumores.

Em 2006, utilizando o rato como modelo, verificou-se que a CatD estimula a via da apoptose dependente de caspases, em células humanas de leucemia. Verificou-se que a indução da apoptose mediada pela CatD é independente da sua actividade catalítica, podendo estar relacionada com os seus aspectos estruturais (Beaujouin *et al.*, 2006).

Apesar dos estudos já desenvolvidos, ainda é prematuro concluir sobre a função primordial da proteinase aspártica CatD nas células animais, assim como ainda não é possível considerar que a sua actividade apoptótica seja maioritariamente devida a uma única via metabólica ou mecanismo de acção (Santos *et al.*, 2007). A clarificação deste conhecimento pode residir no estudo das proteinases aspárticas, utilizadas como alvos terapêuticos contra alguns tipos de cancro.

1.4.1.1. Proteinases aspárticas de origem vegetal

Em contraste com os estudos desenvolvidos em modelos animais, não existem relatos científicos sobre as plantas, nos quais se estabeleça uma relação directa entre uma proteinase aspártica e a sua função específica na morte programada da respectiva célula vegetal. Existem apenas alguns estudos que correlacionam, em termos de mecanismo, algumas proteinases de origem vegetal, nomeadamente as fitepsinas, com os processos de senescência e de morte celular programada em plantas, em analogia com as suas congéneres animais (Panavas *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2002).

Apesar das proteinases aspárticas vegetais apresentarem uma elevada homologia com as proteinases aspárticas animais, as primeiras possuem um domínio exclusivo, nomeadamente um polipéptido com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos denominado *Plant Specific Insert* (PSI).

A função biológica do polipéptido PSI ainda não se encontra totalmente esclarecida. Segundo alguns autores, o PSI está envolvido no trânsito vacuolar, ao interagir com a membrana do retículo endoplasmático (Egas *et al.*, 2000). No entanto, a função mais referenciada para o PSI refere-se ao seu envolvimento na localização dos precursores das proteinases no compartimento celular onde a proteína madura ficará armazenada (Guruprasad *et al.*, 1994).

A sequência de aminoácidos constituintes do PSI é parcial ou completamente removida aquando do processamento e maturação dos precursores das proteinases aspárticas das plantas, restando apenas um enzima com duas cadeias, cuja organização tridimensional é similar à das proteinases aspárticas de mamíferos.

Um caso típico de fitepsinas com um elevado grau de homologia com a CatD são as proteinases aspárticas de origem vegetal, pertencentes à família das ciprosinas (Frazão *et al.*, 1999).

1.5. CIPROSINA

As ciprosinas são proteinases aspárticas isoladas da planta do cardo, que apresentam uma elevada homologia com as proteinases aspárticas de mamíferos.

De acordo com a bibliografia disponível, assiste-se ao longo dos anos a uma diferente nomenclatura das ciprosinas. Inicialmente foram designadas por cinarinas (Macedo *et al.*, 1993), posteriormente por cinarases (Kervinen *et al.*, 1995) e a partir do ano de 1997 foram designadas por ciprosinas (Picon *et al.*, 1997).

As ciprosinas são enzimas descritos como endopeptidases aspárticas heterodiméricas, glicosiladas, constituídas por duas cadeias, nomeadamente a cadeia N-terminal, constituída pelo propéptido N-terminal e pelo péptido maduro N-terminal, e a cadeia C-terminal, constituída pelo péptido maduro C-terminal.

De acordo com as suas características bioquímicas, classificam-se as ciprosinas sob três formas distintas, nomeadamente ciprosina 1, ciprosina 2 e ciprosina 3 (Martins, 1999).

Segundo Cordeiro e colaboradores (1998), a ciprosina 1 apresenta 55% de homologia com a Catepsina D humana. Tal como a ciprosina 2, a ciprosina 1 acumula-se no estado tardio do desenvolvimento da flor do cardo, enquanto a ciprosina 3, que possui uma elevada actividade proteolítica, está presente na fase inicial do desenvolvimento da flor do cardo.

As ciprosinas pertencem a um conjunto de enzimas proteolíticos, que compreende também as cardosinas, as quais são responsáveis pela actividade coagulante do leite. A actividade máxima das cardosinas, na coagulação do leite, é atingida a valores de pH próximos de 5.1, utilizando a caseína como substrato (Cordeiro *et al.*, 1994).

Assim como as cardosinas, as ciprosinas são extraídas da fracção de tonalidade violeta da flor do cardo, mais especificamente dos estigmas, estiletos e da parte superior destes, não sendo detectados os enzimas em sementes, folhas ou nervuras centrais nem em qualquer outro órgão das flores (Veríssimo *et al.*, 1996; Martins, 1999).

A distribuição das ciprosinas, nos diferentes órgãos da planta, sugere que os enzimas podem estar envolvidos em mecanismos de defesa contra insectos, vírus, microrganismos e agentes patogénicos. A sua distribuição ao longo do desenvolvimento floral revela também que a síntese das ciprosinas está relacionada com a degradação de proteínas e diferenciação de células e tecidos. O conteúdo de ciprosinas no cardo varia ao longo do desenvolvimento

da planta, sendo o seu conteúdo mais elevado quando as flores estão em fase de senescência, apresentando-se secas (Cordeiro *et al.*, 1994).

Estudos direccionados para a caracterização das cipsosinas revelaram a sua estrutura global, a sua forma de processamento (típica das fitepsinas), as sequências dos seus domínios intramoleculares e o seu padrão de glicosilação, segundo o qual as cipsosinas possuem nove anéis de açúcar distribuídos entre dois locais de glicosilação. Os açúcares estão localizados à superfície da molécula, um em cada cadeia polipeptídica, longe do local activo. Deste modo, é pouco provável que os açúcares desempenhem alguma função relativamente à sua actividade e especificidade, podendo estar envolvidos na estabilidade conformacional da molécula assim como no correcto processamento do enzima (Frazão, *et al.*, 1999).

A cipsosina é sintetizada sob a forma de uma cadeia única inactiva (pré-proenzima), contendo uma sequência de resíduos adicional, no terminal amínico, designada de propéptido ou péptido de activação, com cerca de 50 aminoácidos e uma sequência de inserção com cerca de 100 aminoácidos (PSI). Todos estes elementos são posterior e sucessivamente removidos para dar origem à forma madura do enzima (Faro *et al.*, 1999).

Estudos por SDS-PAGE demonstraram que as cipsosinas são heterodiméricas, constituídas por dois locais de glicosilação, um na subunidade maior e outro na subunidade menor. A cipsosina 1 apresenta um peso molecular aparente para as subunidades maior e menor de, respectivamente 32.5 kDa e 16.5 kDa, a cipsosina 2 apresenta 33.5 kDa e 16.5 kDa, enquanto os tamanhos das subunidades da cipsosina 3 são 35.5 kDa e 13.5 kDa (Cordeiro *et al.*, 1994).

Actualmente, estudos no âmbito económico-terapêutico das endopeptidases aspárticas revelaram a importância do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) codificante do enzima cipsosina, nomeadamente a sequência do gene CYP11 ser clonada e introduzida em *Saccharomyces cerevisiae*, com o objectivo de produzir o enzima sob a forma recombinante e em larga escala (Pais *et al.*, 2007).

Uma outra linha de estudo, ainda pouco aprofundada, demonstrou que a planta possui um potencial anti-cancerígeno, através das suas propriedades anti-oxidante e anti-mutagénica, capacidade de modulação enzimática e de controlo da morte celular (Miadokova *et al.*, 2008; Valentão *et al.*, 2002).

Estudos recentes demonstraram que as propriedades anti-tumorais das cipsosinas podem estar relacionadas com a sua homologia à CatD de origem animal, quer em estrutura, quer em função apoptótica derivada de mecanismos ainda não totalmente conhecidos (Pais *et al.*, 2007). Foi com base neste pressuposto que se deu início ao estudo do potencial anti-tumoral do extracto de cipsosina.

2. OBJECTIVO

Apesar dos estudos já desenvolvidos em animais e microrganismos sobre a função primordial e caracterização bioquímica e molecular das proteinases aspárticas, ainda existe um conhecimento pouco aprofundado sobre as proteinases aspárticas de origem vegetal. Deste modo, o presente trabalho teve como objectivo (1) estabelecer o ensaio de citotoxicidade mais apropriado para a avaliação do potencial anti-tumoral do extracto de uma proteinase aspártica de origem vegetal, a ciprosina da planta do cardo, *Cynara cardunculus*; (2) estudar *in vitro*, as propriedades anti-tumorais do extracto de ciprosina, como alvo terapêutico contra alguns tipos de cancro; (3) estabelecer os valores do parâmetro IC₅₀ para a determinação da janela terapêutica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho, para o estudo da citotoxicidade de uma proteinase aspártica de origem vegetal, utilizou-se o extracto de ciprosina, testado sob a forma nativa, extraído a partir da planta do cardo, *Cynara cardunculus*. O extracto foi utilizado na sua totalidade, ou seja, constituído pelo heterodímero da proteinase, nomeadamente, o seu propéptido N-terminal, péptido maduro N-terminal e péptido maduro C-terminal.

A amostra de ciprosina foi preparada em tampão Tris-EDTA (TE) – Tris (Trishidroximetilaminometano) a 50 mM e EDTA (Ácido Etilenodiaminotetraacético) a 1 mM (Anexo I).

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais humanas: linha epitelial derivada de carcinoma – HCT116, linha epitelial derivada de fibrossarcoma – HT1080, linha fibroblástica derivada de rabdomiossarcoma – TE671 e linha epitelial derivada de adenocarcinoma – Hela, assim como duas linhas celulares não tumorais: linha epitelial de intestino humano – FHs74 Int e linha epitelial de rim de macaco verde africano – Vero (Tabela II).

O manuseamento das linhas celulares, nomeadamente as inoculações, suplementações e tripsinizações, foi realizado em condições de esterilidade, numa câmara de fluxo laminar.

Tabela II – Linhas celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade, respectivo código atribuído pela companhia *American Type Culture Collection* (ATCC), organismo, órgão ou tecido de origem e tipo de tumor.

	Designação	Código ATCC	Organismo	Órgão ou tecido de origem	Tumor
Linhas celulares tumorais	HCT116	CCL-247 TM	<i>Homo sapiens</i> (Humano)	Cólon	Carcinoma cólon-rectal
	HT1080	CCL-121 TM		Tecido conjuntivo	Fibrossarcoma
	TE671	CCL-136 TM		Tecido muscular	Rabdomiossarcoma
	Hela	CCL-2 TM		Colo do útero	Adenocarcinoma
Linhas celulares não tumorais	FHs74 Int	CCL-241 TM	<i>Homo sapiens</i> (Humano)	Intestino	—
	Vero	CCL-81 TM	<i>Cercopithecus aethiops</i> (Macaco verde africano)	Rim	—

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Desenho experimental

No presente trabalho pretendeu-se estabelecer o ensaio de citotoxicidade *in vitro* mais apropriado para a análise das propriedades antitumorais do extracto de cipsosina, extraído da flor do cardo, assim como estabelecer os valores do parâmetro IC_{50} para a determinação da janela terapêutica (Figura 1).

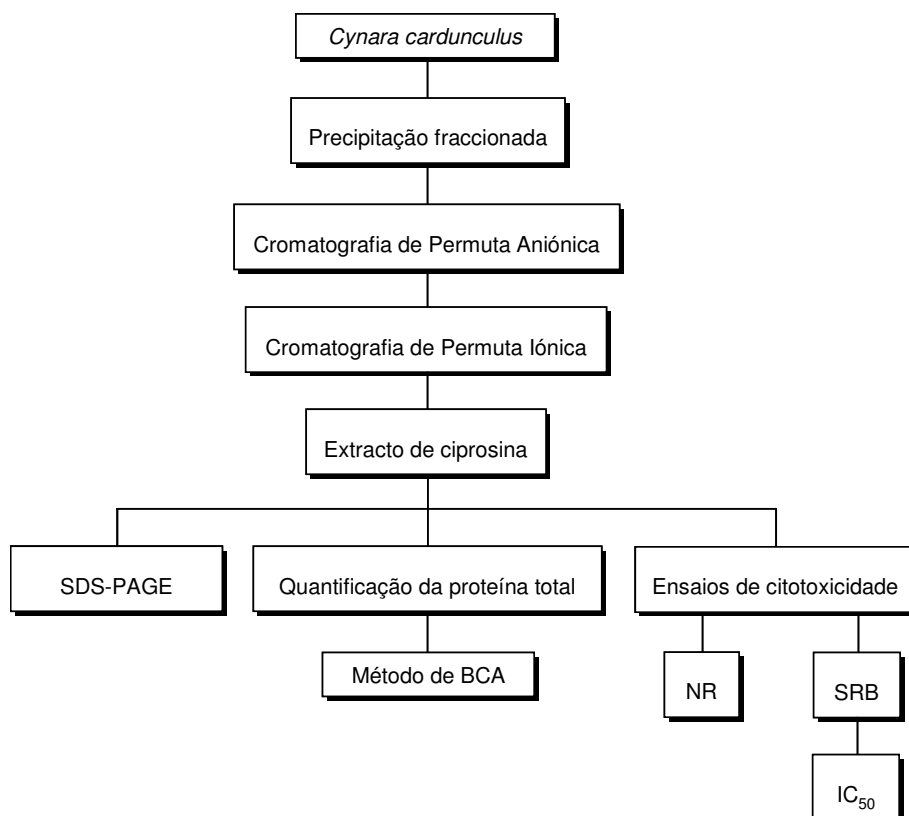


Figura 1 – Representação esquemática do desenho experimental realizado no estudo das propriedades anti-tumorais do extracto de cipsosina. SDS-PAGE – Dodecil Sulfato de Sódio – Electroforese em gel de poliacrilamida; BCA – Ácido Bicinconínico; NR – Vermelho Neutro; SRB – Sulforrodamina B; IC_{50} – Concentração de extracto de cipsosina, à qual se verifica uma redução de 50% de crescimento e viabilidade celulares.

3.2.2. Isolamento e purificação do extracto de cipsosina

A amostra de cipsosina foi fornecida pela Professora Doutora Maria Salomé Pais do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

O extracto de cipsosina foi isolado e purificado a partir de pétalas secas da flor do cardo, de acordo com a metodologia descrita por Brodelius *et al.* (1995).

Isolou-se a mistura proteica das pétalas da flor do cardo com uma solução saturada de sulfato de amónio, por precipitação fraccionada. De modo a separar as proteínas constituintes da mistura proteica, realizou-se uma cromatografia líquida de permuta aniónica, usando uma coluna de fraccionamento de Dietilaminoetil-Sefarose (*DEAE-Sepharose*), utilizando como solvente um gradiente linear de cloreto de sódio. A fracção resultante foi posteriormente purificada, em duas etapas sucessivas, numa coluna Mono Q de cromatografia de permuta aniónica.

3.2.3. Caracterização do extracto de cipsosina purificado por SDS-PAGE

O resultado da caracterização do extracto de cipsosina por SDS-PAGE foi fornecido pela Professora Doutora Maria Salomé Pais do ICAT da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

No intuito de confirmar que a cipsosina é constituída por duas subunidades de diferentes pesos moleculares, realizou-se a técnica de electroforese em gel de poliacrilamida de Sulfato Dodecil de Sódio (SDS-PAGE), que tem como base a mobilidade electroforética das proteínas numa matriz, de acordo com o comprimento da cadeia polipeptídica, que é proporcional ao seu peso molecular.

A técnica de SDS-PAGE foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sampaio *et al.* (2008), utilizaram-se 4% (m/v) de acrilamida (*Bio-Rad Laboratories*) para a realização do gel de empilhamento e 12.5% (m/v) de acrilamida para o gel de separação. Após a preparação dos géis, aplicaram-se no gel 30 μ L do extracto de cipsosina e 5 μ L do marcador molecular (*Bio-Rad Laboratories*) composto por miosina (200.0 kDa), β -galactosidase (116.0 kDa), fosforilase (97.0 kDa), albumina bovina (66.0 kDa), ovalbumina (45.0 kDa), anidrase carbónica (31.0 kDa), inibidor de tripsina (21.5 kDa), lisossoma (14.4 kDa) e aprotinina (6.5 kDa). A separação electroforética decorreu a 180 V, 50 mA, durante 180 minutos.

3.2.4. Caracterização de linhas celulares

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhas celulares apresentadas na Tabela II: quatro linhas celulares tumorais humanas e duas linhas celulares não tumorais.

As linhas celulares encontravam-se criopreservadas em vapor de azoto líquido, no banco celular da empresa ECBio – Investigação e Desenvolvimento, S.A.

As linhas celulares tumorais e não tumorais foram cultivadas de modo a mimetizar as condições *in vivo*, essenciais para a sua proliferação *in vitro*, sendo mantidas de acordo com as suas necessidades nutricionais e características de crescimento.

3.2.4.1. Necessidades nutricionais das linhas celulares

O meio de cultura é um componente importante para o crescimento das linhas e culturas celulares, que fornece aminoácidos, vitaminas, minerais e carboidratos, permitindo às células a produção de novas proteínas essenciais para o seu crescimento, assim como fornecer a energia necessária para o seu metabolismo.

De acordo com as necessidades nutricionais de cada linha celular estudada, utilizou-se um meio de cultura apropriado, com base na informação descrita pela companhia ATCC.

As linhas celulares tumorais HCT116, HT1080 e TE671 foram inoculadas em meio basal *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM (Lonza) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino – FBS (Gibco); 4.5 g/L de glucose (*Sigma-Aldrich*); 6 mM de L-glutamina (*Sigma-Aldrich*) e solução de penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL (*Sigma-Aldrich*).

A linha celular tumoral Hela foi inoculada em meio basal *Minimum Essential Medium Eagle with Earle's Balanced Salt Solution without L-Glutamine* – EMEM (Lonza) suplementado com 10% de FBS (Gibco), 2.1 g/L de solução de bicarbonato de sódio – NaHCO₃ (*Sigma-Aldrich*), 1.0 mM de piruvato de sódio (*Sigma-Aldrich*), 0.1 mM de uma solução de aminoácidos não essenciais – NEAA (*Cambrex*), 1.0 g/L de glucose (*Sigma-Aldrich*), 2 mM de L-glutamina (*Sigma-Aldrich*) e solução de penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL (*Sigma-Aldrich*).

A linha celular não tumoral Vero foi inoculada em meio basal DMEM (*Cambrex*) suplementado com 10% de FBS (Gibco), 3.56 mM de L-glutamina (*Sigma-Aldrich*) e solução de penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL (*Sigma-Aldrich*).

A linha celular não tumoral FHS74 Int foi inoculada em meio basal Hybricare (ATCC) suplementado com 10% de FBS (Gibco), 2.1 g/L de solução de NaHCO₃ (*Sigma-Aldrich*) 2.0 mM de L-glutamina (*Sigma-Aldrich*), 30 ng/mL de Factor de Crescimento Epidérmico – EGF (*Sigma-Aldrich*) e solução de penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL (*Sigma-Aldrich*).

A utilização dos meios de cultura referidos permitiu o crescimento celular de todas as linhas celulares estudadas em sistema de cultura de superfície estática, assim como garantiu que as linhas celulares atingissem a confluência até 5 dias em cultura. Deste modo, a linha celular não tumoral FHS74 Int atingiu a confluência ao fim de 5 dias em cultura, enquanto as restantes linhas celulares atingiram a confluência ao fim de 3 dias em cultura.

3.2.4.2. Crescimento celular das linhas celulares tumorais e não tumorais

No intuito de caracterizar a cinética de crescimento das linhas celulares tumorais e não tumorais efectuaram-se estudos de crescimento em sistema descontínuo de cultura estática,

caracterizado pela capacidade das células crescerem aderentes a suportes próprios para cultura, *T-flask* de 25 cm² de área de cultura (T₂₅) (*Nunc*).

Durante uma semana, observaram-se todos os T₂₅ ao microscópio óptico invertido com contraste de fase (*Leica DMIL*) para avaliar a morfologia celular, confluência, percentagem de células aderentes e em suspensão. Para cada suporte de cultura, retirou-se diariamente uma alíquota do meio sobrenadante, assim como das células aderentes, recorrendo à técnica de tripsinização (Anexo II), contaram-se as células pelo método de exclusão do azul de tripano (Anexo II), de modo a determinar a concentração e viabilidade celulares.

Com base nos valores das contagens foi possível representar graficamente o crescimento celular, assim como determinar a respectiva taxa específica de crescimento (μ) e o tempo de duplicação (td), para cada linha celular tumoral e não tumoral.

3.2.5. Cultura celular

Durante e após o estudo da cinética de crescimento, todas as linhas celulares foram propagadas em sistema de cultura de superfície estática, operadas em descontínuo e mantidas numa incubadora humidificada a 37 °C, numa atmosfera com 7% de CO₂.

As linhas celulares tumorais e não tumorais foram cultivadas com os respectivos meios de cultura, sendo substituída a totalidade do meio de cultura, por meio fresco, uma vez por semana.

As linhas celulares HCT116, HT1080; TE671, Vero e FHs74 Int foram tripsinizadas quando atingiram a confluência máxima, ou seja, quando a população de células aderentes ocupou toda a superfície do suporte de cultura. Por sua vez, as células da linha celular tumoral Hela apresentam inibição por contacto, ou seja, durante o seu crescimento, o contacto entre as células promove a libertação de factores que se ligam a receptores existentes na superfície celular. Consequentemente as células perdem a capacidade de divisão, perdendo mesmo algumas a capacidade de adesão, ficando em suspensão. Deste modo, a linha celular Hela foi tripsinizada quando a população de células aderentes atingiu uma confluência de aproximadamente 80%.

3.2.6. Método de quantificação de proteína total

Dos diversos métodos de determinação da concentração proteica de amostras biológicas, os métodos de *Bradford* (Bradford, 1976), *Lowry* (Lowry, 1951), Biureto (Layne, 1957) e Ácido Bicinconínico – BCA (Stoscheck, 1990), são os mais vulgarmente utilizados. No presente trabalho, quantificou-se a proteína total do extracto de ciprosona pelo método BCA, o qual se baseia na redução do ião de cobre divalente (Cu²⁺) na forma monovalente (Cu⁺) e na consequente detecção colorimétrica do ião monovalente pelo BCA. Numa primeira etapa,

ocorre a ligação do íon de cobre à proteína, num ambiente alcalino, formando-se um complexo de coloração azul. Numa segunda etapa, o BCA detecta colorimetricamente o íon monovalente, reage com o catião de cobre (Cu^+), resultando um produto de coloração púrpura da ligação de duas moléculas de BCA e um íon de cobre monovalente. O complexo Ácido Bicinconínico/Cobre (BCA/Cu) solúvel em água foi analisado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 562 nm, variando o resultado da absorvância proporcionalmente ao aumento da concentração proteica.

3.2.7. Inoculação das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes densidades de inóculo

Previamente aos ensaios de NR e SRB, inoculou-se para cada ensaio de citotoxicidade uma placa de cultura de 96 poços (*Nunc*), para cada linha celular tumoral e não tumoral. As densidades de inoculação de cada linha celular em estudo foram calculadas com base nas respectivas taxas específicas de crescimento, de modo que após 24 horas da inoculação, todas as culturas apresentassem uma confluência de aproximadamente 50% de células aderentes à superfície do suporte de cultura (Tabela III).

Tabela III – Densidades de inóculo (Células/cm²) das linhas celulares inoculadas para os ensaios *in vitro* de citotoxicidade NR e SRB.

	Designação	Densidade de inóculo (Células/cm ²)
Linhas celulares tumorais	HCT116	$3,1 \times 10^4$
	HT1080	$9,4 \times 10^3$
	TE671	$1,6 \times 10^4$
	Hela	$3,1 \times 10^4$
Linhas celulares não tumorais	Vero	$9,4 \times 10^3$
	FHs74 Int	$2,5 \times 10^4$

Nos ensaios de NR e SRB, inocularam-se poços da placa de cultura, cada um com 100 μL de suspensão celular, preparada com o respectivo meio de cultura de cada linha celular, designaram-se esses poços por poços teste. Em cada poço teste foram testadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M e 1×10^{-10} M.

Para cada ensaio de citotoxicidade, de cada linha celular, inocularam-se também os poços delimitantes da placa de cultura, os quais foram designados de poços branco, sendo cada poço constituído por 100 μL do respectivo meio de cultura de cada linha celular, de modo a evitar a evaporação dos poços teste. Inocularam-se também poços constituídos por 100 μL de suspensão celular, nos quais as células proliferaram no respectivo meio de cultura, na ausência

do agente citotóxico, designaram-se esses poços por poços controlo. As culturas foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 24h a 37 °C, em atmosfera controlada de 7% de CO₂.

3.2.7.1. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade são caracterizados como métodos de análise colorimétrica e de luminescência, que analisam a actividade citotóxica de uma substância sobre determinados parâmetros, como a viabilidade e o crescimento celular.

No intuito de estabelecer o ensaio de citotoxicidade mais apropriado para a avaliação do potencial anti-tumoral do extracto de ciprosina, utilizaram-se dois métodos sensíveis de medição da citotoxicidade, através de uma quantificação colorimétrica, das linhas celulares coradas com corantes vitais específicos, nomeadamente o corante vermelho neutro (*Sigma-Aldrich*), utilizado no ensaio de Vermelho Neutro (NR) e o corante Sulforrodamina B (*Sigma-Aldrich*), utilizado no ensaio de Sulforrodamina B (SRB). Como agente citotóxico utilizou-se o paclitaxel, um agente mitótico utilizado terapeuticamente no tratamento de cancro.

3.2.7.2. Método do Vermelho Neutro com o agente citotóxico Paclitaxel

O ensaio do Vermelho Neutro (*Neutral Red* – NR) consiste num método de citotoxicidade, de quantificação colorimétrica da permeabilidade da membrana e da actividade lisossomal das células. Este método permite uma distinção entre as células vivas e mortas, uma vez que se baseia na capacidade das células viáveis incorporarem nos lisossomas e vacúolos, por difusão não-iónica, o corante toluideno vermelho ou vermelho básico (C₁₅H₁₇ClN₄). O corante é usado como indicador quantitativo do número de células e da sua viabilidade, permitindo também a determinação do parâmetro IC₅₀, o qual traduz a concentração à qual determinado composto inibe em 50% a proliferação celular, podendo mesmo conduzir à morte celular.

3.2.7.2.1. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações de paclitaxel

Para cada linha celular, decorridas 24 horas após a inoculação da placa de cultura de 96 poços, removeu-se o meio de cultura de cada poço. De seguida, para cada linha celular, adicionaram-se 50 µL do respectivo meio de cultura, em todos os poços da placa, incluindo controlos e brancos.

Para cada linha celular, nos poços teste das diferentes concentrações de paclitaxel, adicionaram-se 50 µL das diferentes concentrações do agente citotóxico, preparadas com o

respectivo meio de cultura de cada linha celular, de modo a perfazer 5% de FBS na constituição final de cada concentração preparada. Deste modo, para as linhas celulares HCT116, HT1080, TE671, diluiu-se o paclitaxel com o meio de cultura completo provido de 5% de FBS, enquanto que para as linhas celulares Hela, Vero e FHs74 Int, prepararam-se as diluições do agente citotóxico com o respectivo meio de cultura isento de FBS. As linhas celulares foram posteriormente incubadas numa incubadora humidificada, durante 48 horas a 37 °C, numa atmosfera de 7% de CO₂.

3.2.7.2.2. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais

Decorridas 48 horas após a adição das diferentes concentrações de paclitaxel, procedeu-se à avaliação microscópica das placas, de modo a registar a confluência e as características morfológicas das células.

3.2.7.2.3. Medição da incorporação do corante NR

Depois da análise e registo das placas do ensaio NR, removeu-se o meio de cultura, lavaram-se as placas com tampão fosfato-salino (1x) sem cálcio nem cloreto de magnésio (PBS) (*Sigma-Aldrich*) suplementado com 10% de FBS, de seguida removeu-se esta solução de lavagem e adicionaram-se em todos os poços, incluindo controlos e brancos, 250 µL de solução corante NR a 25 µg/mL (Anexo I).

Após a adição da solução corante as placas foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 3 horas a 37 °C em atmosfera controlada de 7% de CO₂, de modo a permitir a incorporação do corante.

Depois do período de incubação removeu-se a solução corante NR, adicionaram-se em todos os poços de cada placa 100 µL de solução de remoção do NR (Anexo I). De modo a facilitar a remoção do corante das células viáveis agitaram-se as placas a 300 rotações por minuto (rpm) num agitador de microplacas (*IKA MTS*) durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

Seguidamente, mediu-se a absorvância do corante libertado a 540 nm num leitor de microplacas (*Spectra Max 340*), de modo a determinar para cada concentração do paclitaxel a percentagem de NR incorporado nas células. Os dados foram registados para posteriormente ser determinado para cada linha celular o valor do parâmetro IC₅₀.

3.2.7.3. Método Sulforrodamina B com o agente citotóxico Paclitaxel

O ensaio de Sulforrodamina B (SRB) consiste num método de citotoxicidade de quantificação colorimétrica da proteína celular (biomassa total) em culturas de células coradas com SRB. O Sulforrodamina B ($C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$) é um corante brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfónicos, solúvel em água. Sob condições ácidas o corante liga-se aos resíduos aminoácidos da proteína básica, em células viáveis previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA) frio a 50% (m/v).

O corante SRB é usado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, sendo este conteúdo proporcionalmente linear à densidade de células. Um aumento ou diminuição do número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade do corante incorporado nas células em cultura, o que indica o grau de citotoxicidade causada pelo composto em estudo (Skehan, *et al.*, 1990).

3.2.7.3.1. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações do paclitaxel

Para cada linha celular, decorridas 24 horas após a inoculação da placa de cultura de 96 poços, em cada poço teste adicionaram-se 100 μ L das diferentes concentrações de paclitaxel, preparadas com o respectivo meio de cultura de cada linha celular, de modo a perfazer 5% de FBS na constituição final de cada concentração preparada. Deste modo, para as linhas celulares HCT116, HT1080, TE671, diluiu-se o paclitaxel com o meio de cultura completo provido de 5% de FBS, enquanto que para as linhas celulares Hela, Vero e FHS74 Int, prepararam-se as diluições com o respectivo meio de cultura isento de FBS. Posteriormente, as linhas celulares foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 48 horas, a 37 °C, numa atmosfera de 7% de CO_2 .

3.2.7.3.2. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais

Decorridas 48 horas após a adição das diferentes concentrações do paclitaxel, procedeu-se à avaliação microscópica das placas, de modo a registar a confluência e as características morfológicas das células.

3.2.7.3.3. Quantificação colorimétrica da proteína celular

Depois da análise e registo das placas do ensaio SRB adicionaram-se 50 μ L de TCA frio a 50% (m/v) (Anexo I) em todos os poços, incluindo brancos e controlos. Para facilitar

a fixação das células à superfície da placa de cultura, as placas foram mantidas durante 1 hora a 4 °C.

Após o período de fixação, removeu-se o TCA, lavou-se cada poço cinco vezes com 250 µL de água destilada. Após a última lavagem, adicionaram-se em cada poço das placas, 100 µL de solução de SRB a 0,4% (m/v) (Anexo I). Incubaram-se as placas de cultura à temperatura ambiente (20 a 25 °C), durante 30 minutos, protegidas da luz, de modo a permitir a incorporação do corante.

Depois do período de incubação removeu-se a solução corante SRB e lavou-se cinco vezes cada poço com 250 µL de ácido acético a 1% (v/v) (Anexo I). Após a última lavagem adicionaram-se em cada poço 200 µL de Tris Base a 10 mM (Anexo I), com o intuito de lisar as células e conseqüentemente libertar as proteínas coradas com SRB. A libertação das proteínas coradas foi assegurada com a agitação das placas de 96 poços a 300 rpm, num agitador de microplacas (*IKA MTS*) durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

O ensaio de SRB terminou com a quantificação colorimétrica da proteína celular, a qual é directamente proporcional à biomassa celular. Nesse sentido, mediu-se a absorvância do corante libertado a 515 nm num leitor de microplacas (*Spectra Max 340*), sendo deste modo possível determinar o crescimento relativo ou a viabilidade de células, após terem sido submetidas a determinada concentração do paclitaxel. Os dados foram registados para posteriormente ser determinado para cada linha celular o valor do parâmetro IC₅₀.

3.2.7.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO TAMPÃO Tris-EDTA

3.2.7.4.1. Inoculação das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes densidades de inóculo

Uma vez estabelecido o ensaio de citotoxicidade mais apropriado para a avaliação do potencial anti-tumoral do extracto de cipsosina, pretendeu-se verificar também se o tampão do extracto enzimático, nomeadamente o tampão Tris-EDTA (TE), possuía alguma actividade citotóxica nas linhas celulares em estudo. De acordo com alguns autores, o EDTA pode actuar como agente citotóxico, impedindo o aparecimento de novas divisões mitóticas (Lanigan e Yamarik, 2002).

Deste modo, para a avaliação da citotoxicidade do tampão TE, inoculou-se uma placa de cultura de 96 poços (*Nunc*) para cada linha celular tumoral e não tumoral, com a mesma densidade de inóculo utilizada para os ensaios de NR e SRB com o agente citotóxico paclitaxel (Anterior Tabela III).

Tendo em consideração que a amostra de cipsosina foi preparada em tampão TE, constituído por Tris a 50 mM e EDTA a 1 mM, testou-se individualmente o efeito do tampão TE a diferentes concentrações, as quais mimetizam cada uma das diluições a efectuar a partir do *stock* do extracto de cipsosina. Deste modo, a primeira concentração de TE a ser testada representa a concentração do tampão presente na diluição mais concentrada do extracto de cipsosina a ser analisada, nomeadamente 36 mM de Tris e 0,7 mM de EDTA. A partir desta primeira concentração de tampão TE realizaram-se as restantes concentrações teste, as quais resultaram de seis diluições seriadas de 1/10 cada.

Na placa de cultura de cada linha celular em estudo, inocularam-se vários poços, designados por poços teste, cada um contendo 100 µL de suspensão celular, preparada com o respectivo meio de cultura de cada linha celular. Em cada poço teste foram testadas diferentes concentrações de tampão TE. Inocularam-se também os poços delimitantes de cada placa de cultura, os quais foram designados de poços branco, contendo cada poço 100 µL do respectivo meio de cultura de cada linha celular, de modo a evitar a evaporação dos poços teste. Para cada placa de cultura, inocularam-se poços controlo, contendo cada 100 µL de suspensão celular, nos quais as células proliferaram no respectivo meio de cultura, na ausência do tampão TE. As culturas foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 24h a 37 °C, em atmosfera controlada de 7% de CO₂.

3.2.7.4.2. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações do tampão TE

Para cada linha celular, em cada poço teste adicionaram-se 100 µL das diferentes concentrações do tampão TE, preparadas com o respectivo meio de cultura de cada linha

celular, de modo a perfazer 5% de FBS na constituição final de cada concentração. Deste modo, para as linhas celulares HCT116, HT1080, TE671, diluiu-se o tampão TE com o meio de cultura completo provido de 5% de FBS, enquanto que para as linhas celulares Hela, Vero e FHs74 Int, prepararam-se as diluições com o respectivo meio de cultura isento de FBS.

Nos poços branco e controlo adicionaram-se 100 μ L do respectivo meio de cultura isento de FBS. Posteriormente, as linhas celulares foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 48 horas a 37 °C, numa atmosfera de 7% de CO₂.

3.2.7.4.3. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais

Decorridas 48 horas após a adição das diferentes concentrações do tampão TE, procedeu-se à avaliação microscópica de todas as placas, de modo a registar a confluência e as características morfológicas das células.

3.2.7.4.4. Quantificação colorimétrica através do método SRB

Realizou-se a quantificação colorimétrica das linhas celulares expostas à acção do tampão TE, através do método de SRB, para o qual se utilizou a mesma metodologia descrita na quantificação colorimétrica da proteína celular (Secção 3.2.7.3.3.).

O ensaio de SRB terminou com a medição da absorvância do corante libertado a 515 nm num leitor de microplacas (*Spectra Max 340*), sendo deste modo possível determinar o crescimento relativo ou a viabilidade de células, após terem sido submetidas a determinada concentração do tampão TE. Os dados foram registados para posteriormente ser determinado para cada linha celular o valor do parâmetro IC₅₀.

3.2.7.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRACTO DE CIPROSINA

3.2.7.5.1. Inoculação das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes densidades de inóculo

Uma vez avaliada a citotoxicidade do tampão TE, determinou-se a actividade citotóxica do extracto de ciprosina. Deste modo, inoculou-se uma placa de cultura de 96 poços (*Nunc*) para cada linha celular tumoral e não tumoral, com a mesma densidade de inóculo utilizada nos ensaios anteriores de citotoxicidade (Anterior Tabela III).

Para cada linha celular, inocularam-se vários poços da placa de cultura, designados de poços teste, cada um contendo 100 μL de suspensão celular, preparada com o respectivo meio de cultura de cada linha celular. Em cada poço teste foram testadas diferentes concentrações do extracto de ciprosina, nomeadamente 1000 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,01 $\mu\text{g/mL}$ e 0,001 $\mu\text{g/mL}$.

Para cada linha celular, inocularam-se os poços delimitantes da placa de cultura, os quais foram designados de poços branco, contendo cada poço 100 μL do respectivo meio de cultura de cada linha celular, de modo a evitar a evaporação dos poços teste. Inocularam-se também poços controlo, cada um contendo 100 μL de suspensão celular, nos quais as células proliferaram no respectivo meio de cultura, na ausência do agente citotóxico. As culturas foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera controlada de 7% de CO_2 .

3.2.7.5.2. Exposição das linhas celulares tumorais e não tumorais a diferentes concentrações do extracto de ciprosina

Para cada linha celular, em cada poço teste adicionaram-se 100 μL das diferentes concentrações do extracto de ciprosina, preparadas com o respectivo meio de cultura de cada linha celular, de modo a perfazer 5% de FBS na constituição final de cada concentração. Nesse sentido, prepararam-se as diluições do extracto de ciprosina do mesmo modo que as diluições do tampão TE.

Nos poços branco e controlo adicionaram-se 100 μL do respectivo meio de cultura isento de FBS. Posteriormente, as linhas celulares foram incubadas numa incubadora humidificada, durante 48 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$, numa atmosfera de 7% de CO_2 .

3.2.7.5.3. Avaliação microscópica das linhas celulares tumorais e não tumorais

Decorridas 48 horas após a adição das diferentes concentrações do extracto de ciprofloxacin, procedeu-se à avaliação microscópica de todas as placas, de modo a registar a confluência e as características morfológicas das células.

3.2.7.5.4. Quantificação colorimétrica através do método SRB

Realizou-se a quantificação colorimétrica das linhas celulares expostas à acção do extracto de ciprofloxacin, através do método de SRB, para o qual se utilizou a mesma metodologia descrita na quantificação colorimétrica da proteína celular (Secção 3.2.7.3.3.).

O ensaio de SRB terminou com a medição da absorvância do corante libertado a 515 nm num leitor de microplacas (*Spectra Max 340*), sendo deste modo possível determinar o crescimento relativo ou a viabilidade de células, após terem sido submetidas a determinada concentração do extracto de ciprofloxacin. Os dados foram registados para posteriormente ser determinado para cada linha celular o valor do parâmetro IC_{50} .

3.2.8. Registo fotográfico

Todas as culturas das linhas celulares utilizadas no presente trabalho foram analisadas e registadas fotograficamente através de um microscópio óptico invertido com contraste de fase (*Leica DMIL*) acoplado a uma câmara digital (*Leica DFC320*). As referidas culturas foram registadas fotograficamente a uma ampliação de 100x, tendo sido aleatoriamente seleccionados quatro campos de visão, para cada registo fotográfico.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do extracto de ciprosina purificado por SDS-PAGE

A caracterização por SDS-PAGE permitiu confirmar que a ciprosina é constituída por duas subunidades de diferentes pesos moleculares, nomeadamente a subunidade maior que apresenta um peso molecular aparente de cerca de 31 kDa e a subunidade menor que possui cerca de 14 kDa (Figura 2).

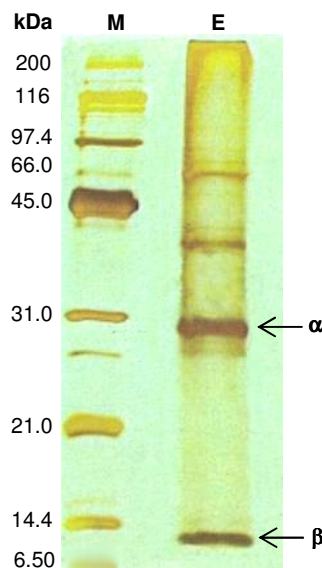


Figura 2 – Fotografia do gel de SDS-PAGE, onde são apresentados os marcadores (**M**) com os seus respectivos pesos moleculares em kDa e o extracto de ciprosina (**E**), onde são evidenciadas por setas, a subunidade grande com um peso molecular aparente de cerca de 31 kDa (α) e a subunidade pequena com cerca de 14 kDa (β).

4.2. Caracterização do crescimento celular

Com base nos resultados, verificou-se que as células de todas as linhas celulares estudadas apresentam um crescimento em monocamada aderente à superfície do suporte de cultura.

As células HCT116 (Figura 3A) e HT1080 (Figura 3B) possuem uma morfologia típica das células epiteliais, ou seja, apresentam uma forma arredondada e agregam-se entre si durante o seu crescimento. As células TE671 (Figura 3C) são multinucleadas e possuem uma morfologia fusiforme. As células Hela (Figura 3D) possuem uma morfologia claramente poliédrica, enquanto as células Vero (Figura 3E) apresentam uma forma ligeiramente poliédrica. As células FHs74 Int (Figura 3F) são fusiformes, sendo o contorno das células pouco definido.

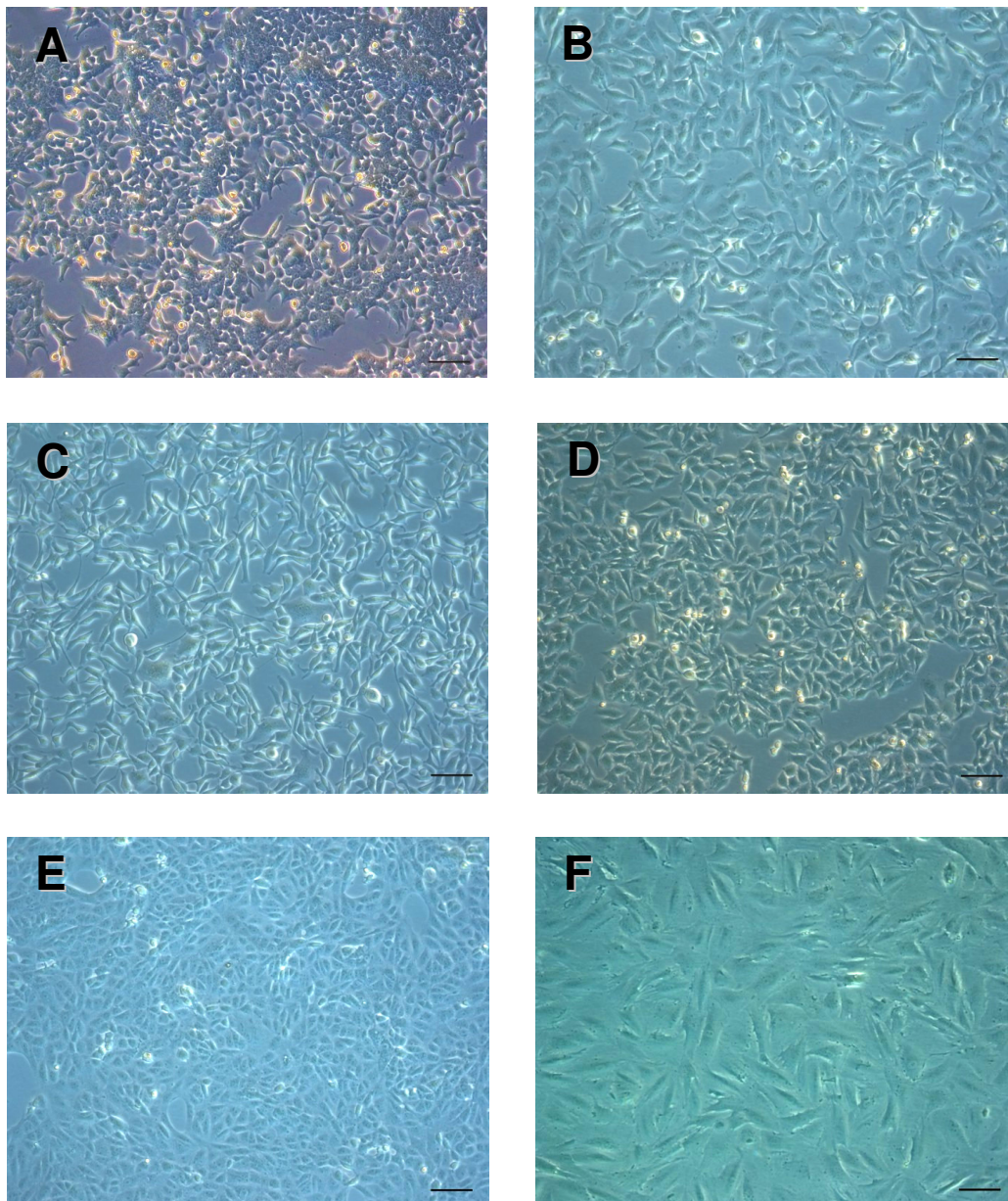


Figura 3 – Morfologia das linhas celulares estudadas em sistema de cultura estática. **(A)** – Linha celular tumoral HCT116; **(B)** – Linha celular tumoral HT1080; **(C)** – Linha celular tumoral TE671; **(D)** – Linha celular tumoral Hela; **(E)** – Linha celular não tumoral Vero; **(F)** – Linha celular não tumoral FHs74 Int. Barra de escala 100 μm .

Com base nos dados de concentração e viabilidade celulares obtidos ao longo do estudo de crescimento, definiu-se graficamente a cinética de crescimento de cada linha celular (Figura 4).

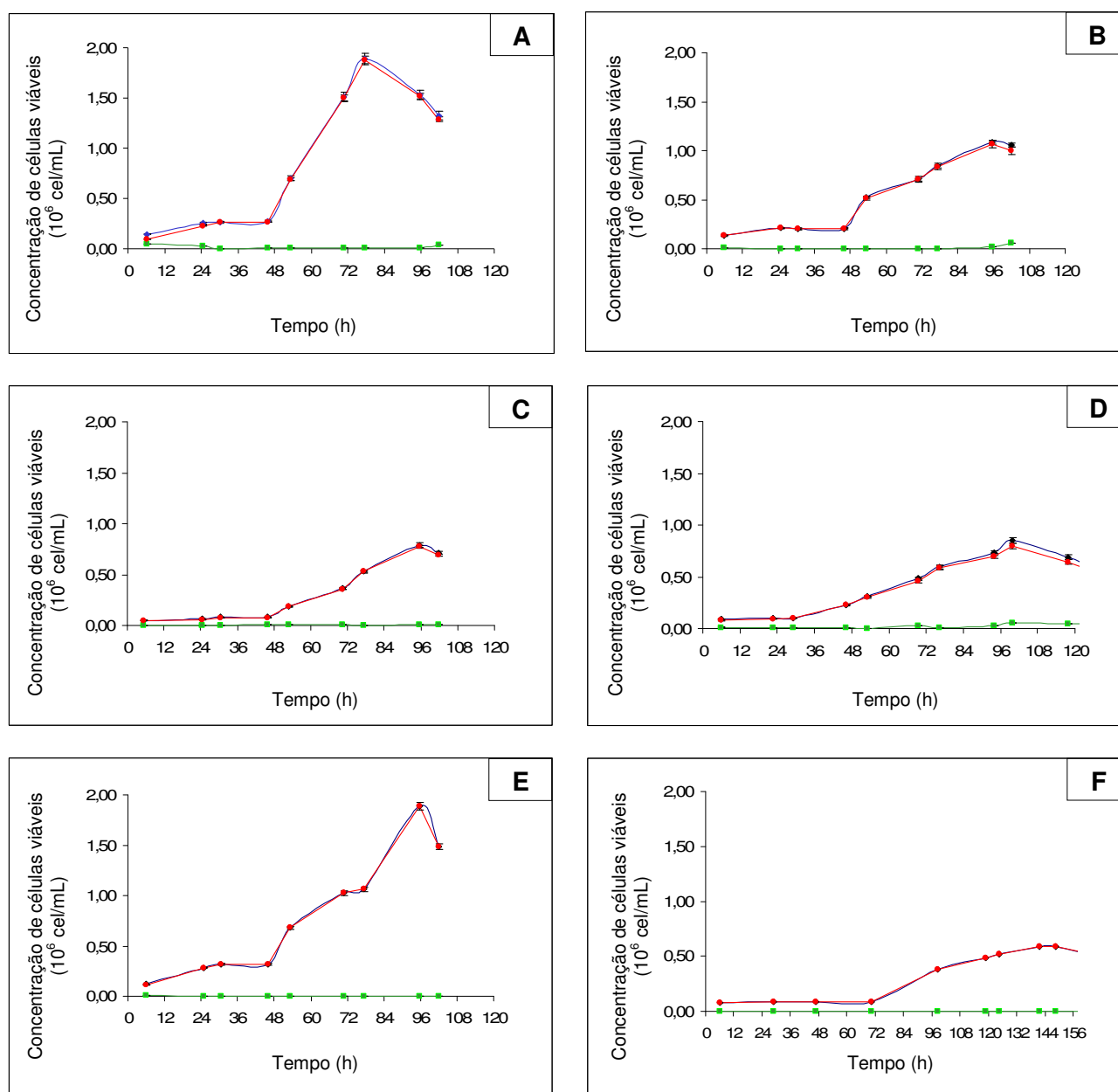


Figura 4 – Representação gráfica da cinética de crescimento em sistema de cultura estática, das linhas celulares tumorais e não tumorais, que traduz a concentração de células viáveis, nomeadamente células totais, células aderentes e em suspensão em função do tempo. **(A)** – Linha celular tumoral HCT116; **(B)** – Linha celular tumoral HT1080; **(C)** – Linha celular tumoral TE671; **(D)** – Linha celular tumoral Hela; **(E)** – Linha celular não tumoral Vero; **(F)** – Linha celular não tumoral FHs74 Int. Células totais – ●; Células aderentes – ◆; Células em suspensão – ■.

De acordo com a representação gráfica da cinética de crescimento verificou-se que nas linhas celulares HCT116, HT1080, TE671 e Vero, a fase de adaptação metabólica (fase de latência) demorou o mesmo período de tempo, aproximadamente 48 horas. Deste modo a sua fase exponencial iniciou-se aproximadamente ao mesmo tempo, tendo ocorrido o início da fase estacionária a tempos diferentes.

A linha tumoral Hela apresentou uma menor fase de latência, de aproximadamente 30 horas, enquanto que a linha não tumoral FHs74 Int apresentou uma fase de adaptação de 72 horas.

Verificou-se também que a linha tumoral HCT116 atingiu uma concentração celular (1.9×10^6 cel/mL) superior à das restantes linhas celulares, enquanto a linha não tumoral FHs74 Int atingiu a menor concentração celular, nomeadamente 0.5×10^6 cel/mL.

O estudo de crescimento permitiu também determinar para cada linha celular a respectiva taxa específica de crescimento (μ), a qual se traduz como o declive da recta de regressão linear resultante da representação gráfica da concentração celular em função do integral cumulativo da concentração ao longo do tempo, correspondente ao crescimento exponencial (Figura 5).

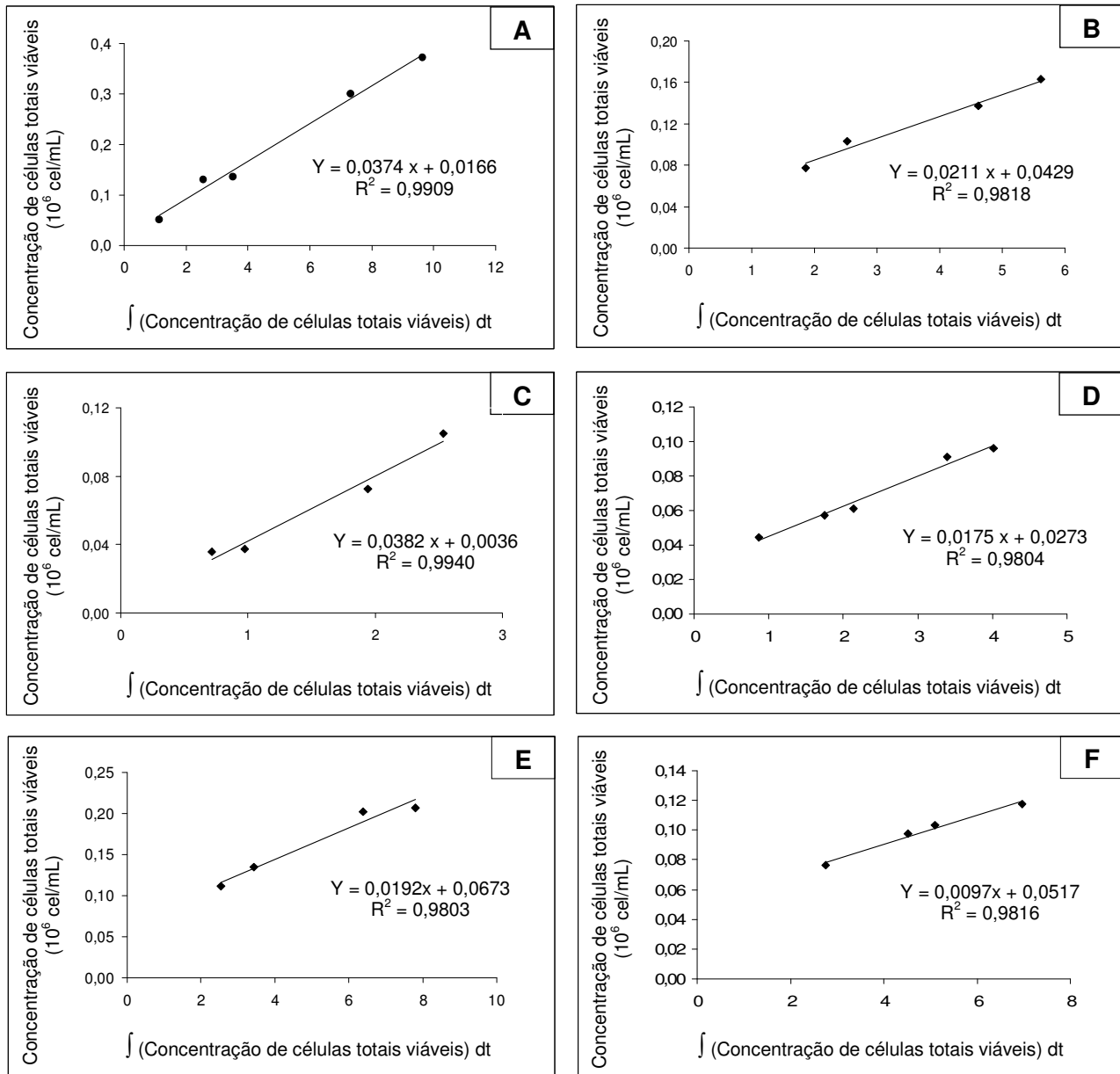


Figura 5 – Representação gráfica da recta de regressão linear da concentração celular em função do integral cumulativo da concentração de células totais viáveis ao longo do tempo, correspondente ao crescimento exponencial, cujo declive traduz a taxa específica de crescimento das linhas celulares estudadas. **(A)** – Linha celular tumoral HCT116; **(B)** – Linha celular tumoral HT1080; **(C)** – Linha celular tumoral TE671; **(D)** – Linha celular Hela; **(E)** – Linha celular não tumoral Vero; **(F)** – Linha celular não tumoral FHs74 Int.

Com base nos resultados obtidos da taxa específica de crescimento de cada linha celular, determinou-se através da equação 1, o tempo de duplicação (t_d), o qual traduz a duração de tempo das gerações ocorridas durante a fase de crescimento exponencial. Entenda-se como geração o tempo necessário para ocorrer a duplicação do número de células (Tabela V).

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Equação (1)}$$

Tabela V – Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) das linhas celulares tumorais e não tumorais utilizadas.

	Designação	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Tempo de duplicação (h)
Linhas celulares tumorais	HCT116	0,0374	19
	HT1080	0,0211	33
	TE671	0,0382	18
	Hela	0,0175	39
Linhas celulares não tumorais	Vero	0,0192	36
	FHs74 Int	0,0097	71

Com base nos resultados obtidos verificou-se que das linhas celulares estudadas, as linhas tumorais HCT116 e TE671 apresentam os valores mais elevados de taxa específica de crescimento ($0.0374 h^{-1}$ e $0.0382 h^{-1}$, respectivamente) e consequentemente o menor tempo de duplicação (19 horas e 18 horas, respectivamente). Por sua vez, a linha não tumoral FHs74 Int apresenta o menor valor de taxa específica ($0,0097 h^{-1}$), a qual traduz o seu lento crescimento, com um tempo de duplicação de 71 horas.

4.3. Ensaios de citotoxicidade

No intuito de determinar qual o ensaio de citotoxicidade mais apropriado para a avaliação do potencial anti-tumoral do extracto de ciprosona, realizaram-se previamente os ensaios de Vermelho Neutro (NR) e Sulforrodamina B (SRB), tendo-se utilizado como agente citotóxico o paclitaxel.

No ensaio de NR, a citotoxicidade do paclitaxel foi analisada por microscopia e por espectrofotometria, o que permitiu, respectivamente, analisar as diferenças morfológicas das células e quantificar colorimetricamente o corante NR incorporado nas células viáveis, após uma exposição a diferentes concentrações do agente citotóxico.

O ensaio SRB teve também como base uma análise microscópica e espectrofotométrica. O corante foi usado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, o que permitiu determinar o grau de citotoxicidade causado pelo paclitaxel.

4.3.1. Avaliação do efeito citotóxico do paclitaxel

4.3.1.1. Linha celular tumoral HCT116

Com base na análise por microscopia das células expostas a diferentes concentrações do paclitaxel, verificou-se que na linha celular HCT116 o efeito citotóxico do agente foi verificado às concentrações de 1×10^{-8} M a 1×10^{-3} M. Comparativamente ao controlo (Figura 6A), as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M (Figura 6B) apresentaram um crescimento e morfologia normais, não tendo sido detectados quaisquer sinais de lise. Por outro lado, as células submetidas à acção do paclitaxel às concentrações de 1×10^{-8} M a 1×10^{-6} M (Figura 6C) apresentaram-se mais pequenas e redondas. Verificou-se que nas células HCT116, o efeito citotóxico do paclitaxel foi sentido no seu máximo às concentrações de 1×10^{-5} M a 1×10^{-3} M (Figura 6D), uma vez que ocorreu a lise de toda a população celular

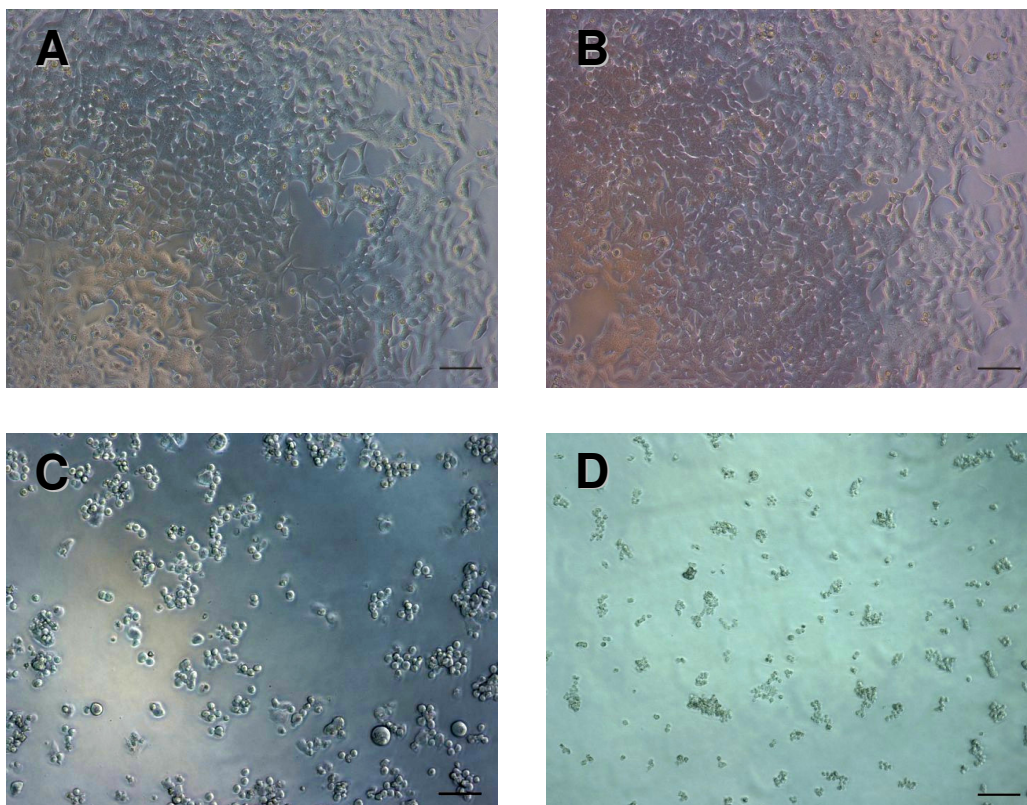


Figura 6 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral **HCT116**. **(A)** – População controlo, não exposta ao composto citotóxico; **(B)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-9} M; **(C)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-6} M; **(D)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-3} M. Barra de escala: 100 μ m.

Perante as observações morfológicas das células, seria de esperar que a representação gráfica da acção citotóxica do paclitaxel, resultante da análise espectrofotométrica dos ensaios de citotoxicidade NR e SRB, revelasse uma taxa de viabilidade elevada na população celular exposta às concentrações de paclitaxel a 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M. No entanto, segundo o ensaio de NR a população celular exposta à concentração de 1×10^{-9} M apresenta uma taxa de viabilidade muito baixa, o que traduz a reduzida sensibilidade do método NR.

As representações gráficas de ambos os métodos de citotoxicidade traduziram a taxa de viabilidade nula da linha tumoral HCT116 às concentrações de 1×10^{-5} M a 1×10^{-3} M, uma vez que a estas concentrações ocorreu a lise da totalidade da população celular.

Analisando os resultados da avaliação microscópica, assim como a representação gráfica dos métodos de citotoxicidade, verificou-se que o ensaio de SRB é mais sensível que o ensaio de NR (Figura 7).

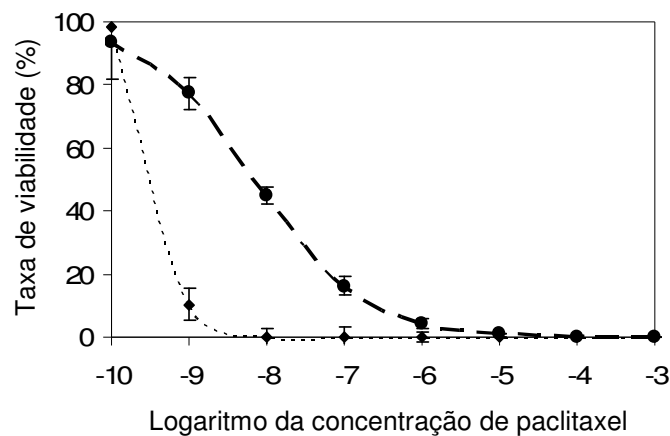


Figura 7 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, que traduz a taxa de viabilidade da linha celular tumoral **HCT116**, em função do logaritmo da concentração de paclitaxel. Ensaio NR —◆— ; Ensaio SRB —●—

4.3.1.2. Linha celular tumoral HT1080

Com base na análise microscópica da linha celular HT1080, comparativamente ao controlo (Figura 8A), as células expostas 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M (Figura 8B) de paclitaxel apresentaram um crescimento e morfologia normais. No entanto, as células apresentaram uma elevada sensibilidade à acção do paclitaxel à concentração de 1×10^{-8} M (Figura 8C), uma vez que a esta concentração as células apresentaram uma morfologia redonda, contrastante à morfologia das células controlo. Observou-se também que a esta concentração ocorreu a morte de quase toda a população celular. Verificou-se que ocorreu a lise da totalidade das células expostas ao agente paclitaxel à concentração de 1×10^{-3} M (Figura 8D).

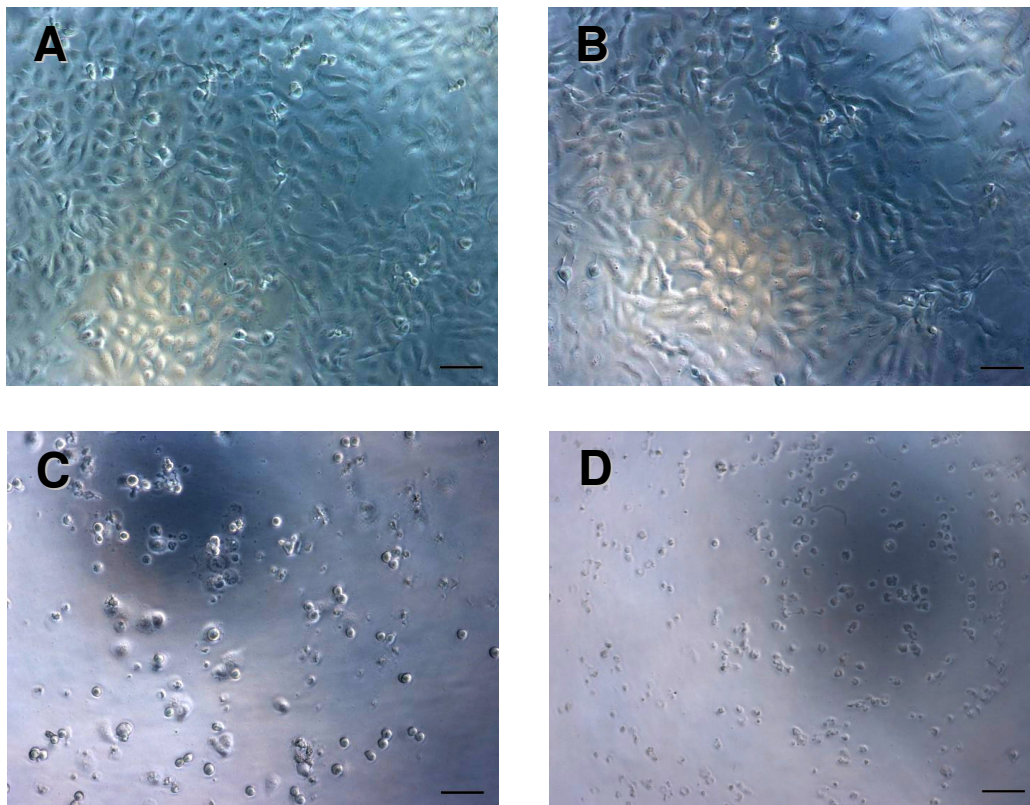


Figura 8 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral **HT1080**. **(A)** – População controlo, não exposta ao composto citotóxico; **(B)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-9} M; **(C)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-8} M; **(D)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-3} M. Barra de escala: 100 μ m.

De acordo com a representação gráfica verificou-se que o ensaio de SRB é o ensaio colorimétrico mais sensível. As células HT1080 expostas à concentração de 1×10^{-8} M de paclitaxel estavam completamente lisadas, o que se traduz numa taxa de viabilidade nula. No entanto, segundo o ensaio de NR as células expostas a essa concentração apresentaram uma viabilidade de 40%.

Deste modo, a representação gráfica da acção citotóxica do paclitaxel, na linha celular tumoral HT1080, revelou mais uma vez que o método de SRB é mais sensível que o método NR (Figura 9)

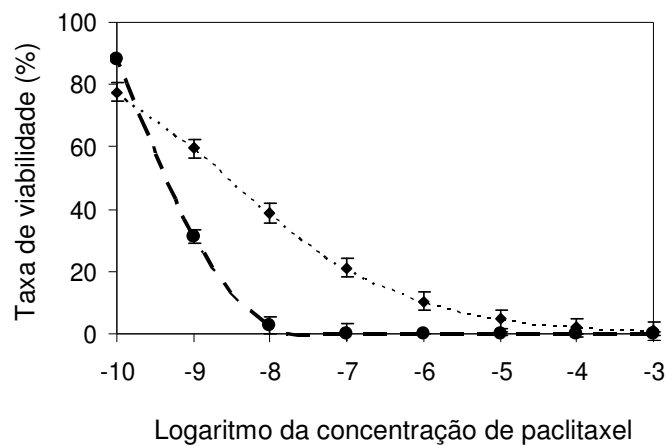


Figura 9 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, que traduz a taxa de viabilidade da linha celular tumoral **HT1080**, em função do logaritmo da concentração do paclitaxel. Ensaio NR♦..... ; Ensaio SRB -●--

4.3.1.3. Linha celular tumoral TE671

Com base na análise microscópica da linha celular TE671, comparativamente ao controlo (Figura 10A), as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M (Figura 10B) apresentaram um crescimento e morfologia normais. Perante uma exposição ao agente citotóxico às concentrações de 1×10^{-8} M a 1×10^{-6} M (Figura 10C) as células tornaram-se mais arredondadas que as células controlo, apresentando uma confluência de aproximadamente 50%. Verificou-se que ocorreu a lise da maioria da população celular, quando exposta ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-5} M a 1×10^{-3} M (Figura 10E).

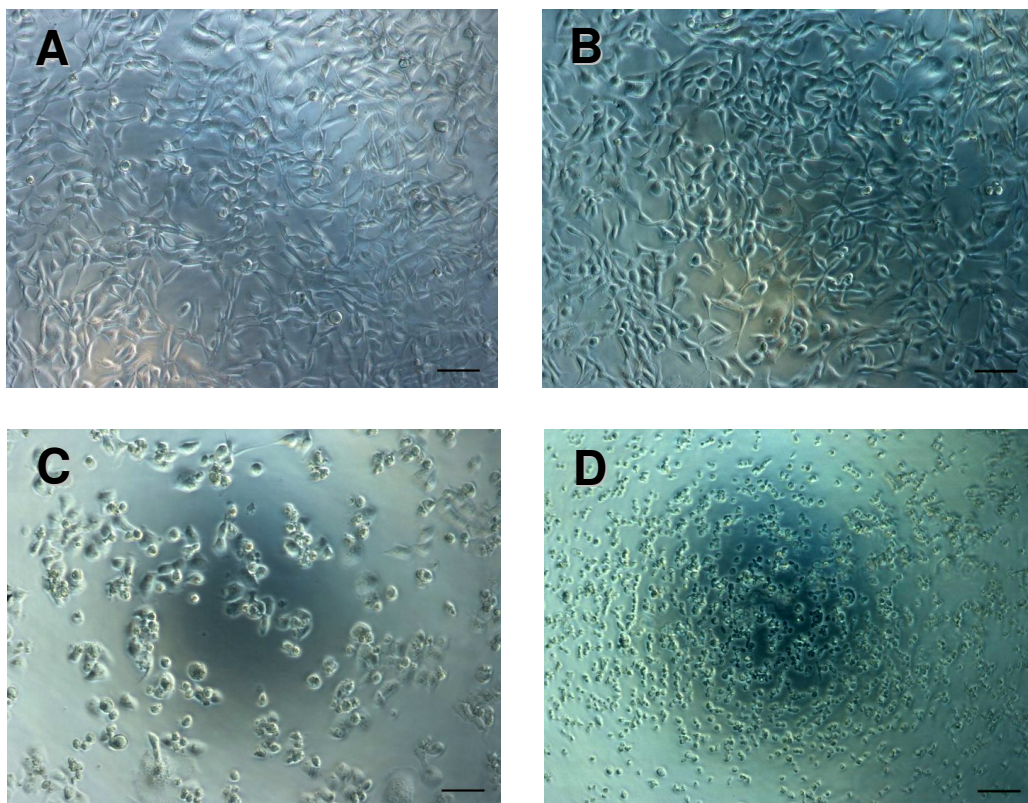


Figura 10 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral **TE671**. **(A)** – População controlo, não exposta ao composto citotóxico; **(B)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-9} M; **(C)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-6} M; **(D)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-3} M. Barra de escala: 100 μ m.

A representação gráfica da acção citotóxica do paclitaxel na linha celular tumoral TE671, quer no ensaio NR quer no ensaio SRB, traduz de forma correcta os resultados da análise microscópica da morfologia da população celular submetida às diferentes concentrações do agente citotóxico (Figura 11).

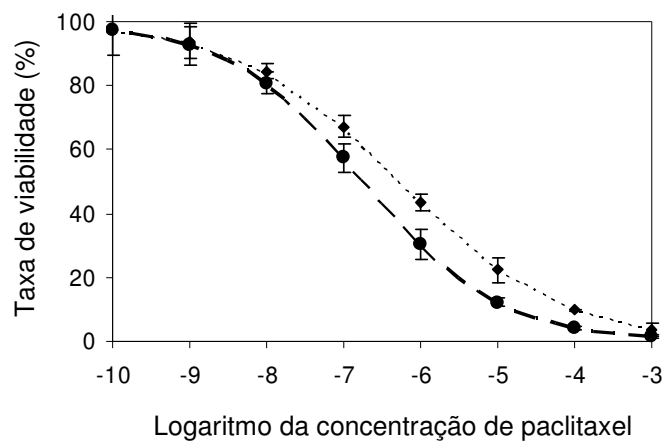


Figura 11 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, que traduz a taxa de viabilidade da linha celular tumoral **TE671**, em função do logaritmo da concentração do paclitaxel. Ensaio NR —◆— ; Ensaio SRB —●—

4.3.1.4. Linha celular tumoral Hela

Com base na análise microscópica da linha celular tumoral Hela, comparativamente à população controlo (Figura 12A) as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M (Figura 12B) apresentaram um crescimento e morfologia normais. As células submetidas à acção do paclitaxel à concentração de 1×10^{-8} M (Figura 12C) apresentaram-se redondas e demonstraram um menor crescimento relativamente às células controlo. Verificou-se que ocorreu a lise da totalidade da população celular, quando exposta ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-7} M a 1×10^{-3} M (Figura 12D).

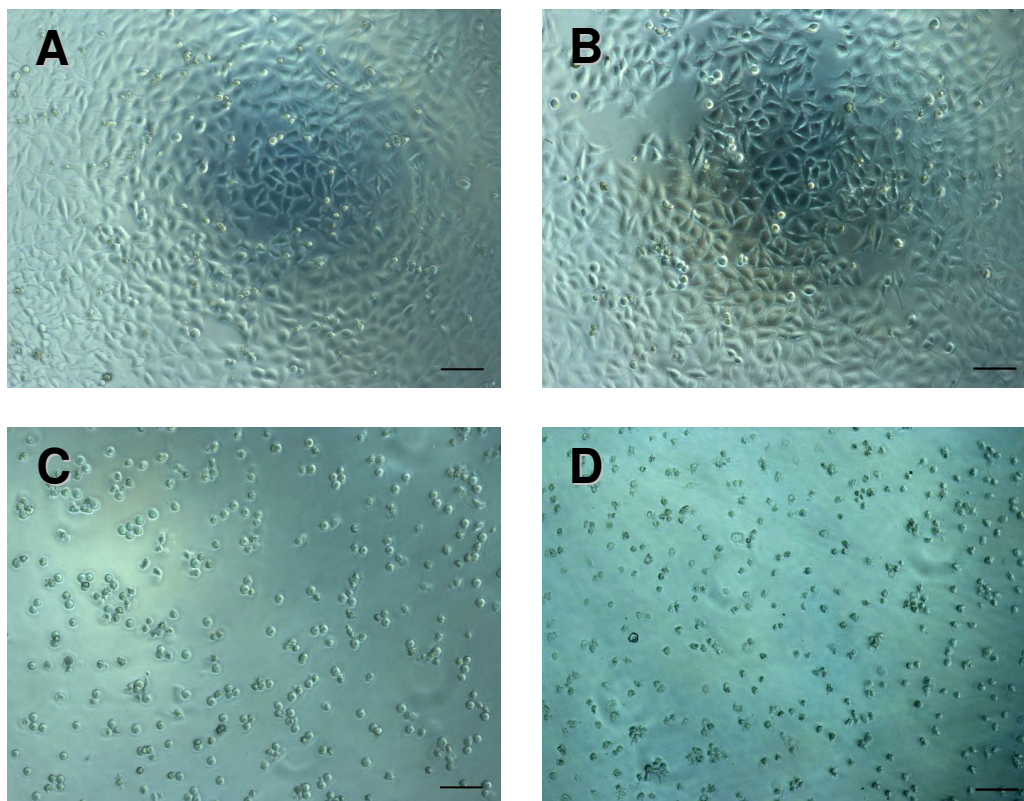


Figura 12 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular tumoral **Hela**. **(A)** – População controlo, não exposta ao composto citotóxico; **(B)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-9} M; **(C)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-8} M; **(D)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-3} M. Barra de escala: 100 μ m.

Ao analisar o gráfico da acção citotóxica do paclitaxel na linha celular Hela, verificou-se que a representação gráfica resultante do ensaio NR não corresponde aos resultados da análise microscópica da morfologia das células, o que traduz uma vez mais o reduzido grau de sensibilidade do método (Figura 13). Pelo contrário, o método SRB confirma a coerência com os resultados obtidos pela análise morfológica.

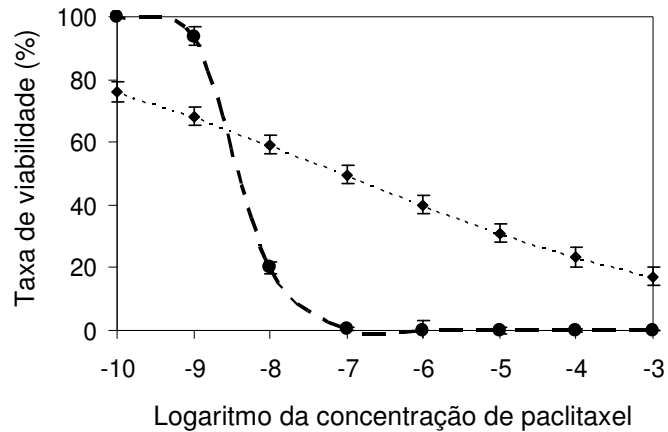


Figura 13 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, que traduz a taxa de viabilidade da linha celular tumoral **Hela**, em função do logaritmo da concentração do paclitaxel. Ensaio NR ; Ensaio SRB

4.3.1.5. Linha celular não tumoral Vero

Com base na análise microscópica da linha celular não tumoral Vero, comparativamente ao controlo (Figura 14A), as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M a 1×10^{-8} M (Figura 14B) apresentaram um crescimento e morfologia normais. As células expostas à concentração de 1×10^{-7} M (Figuras 14C) tornaram-se mais arredondadas, tendo sido detectado uma redução do seu crescimento, comparativamente às células controlo. Verificou-se que ocorreu a lise da maioria da população celular, quando exposta ao paclitaxel à concentração de 1×10^{-5} M, ocorrendo mesmo a lise da totalidade das células, perante uma exposição ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-4} M e 1×10^{-3} M (Figuras 14D).

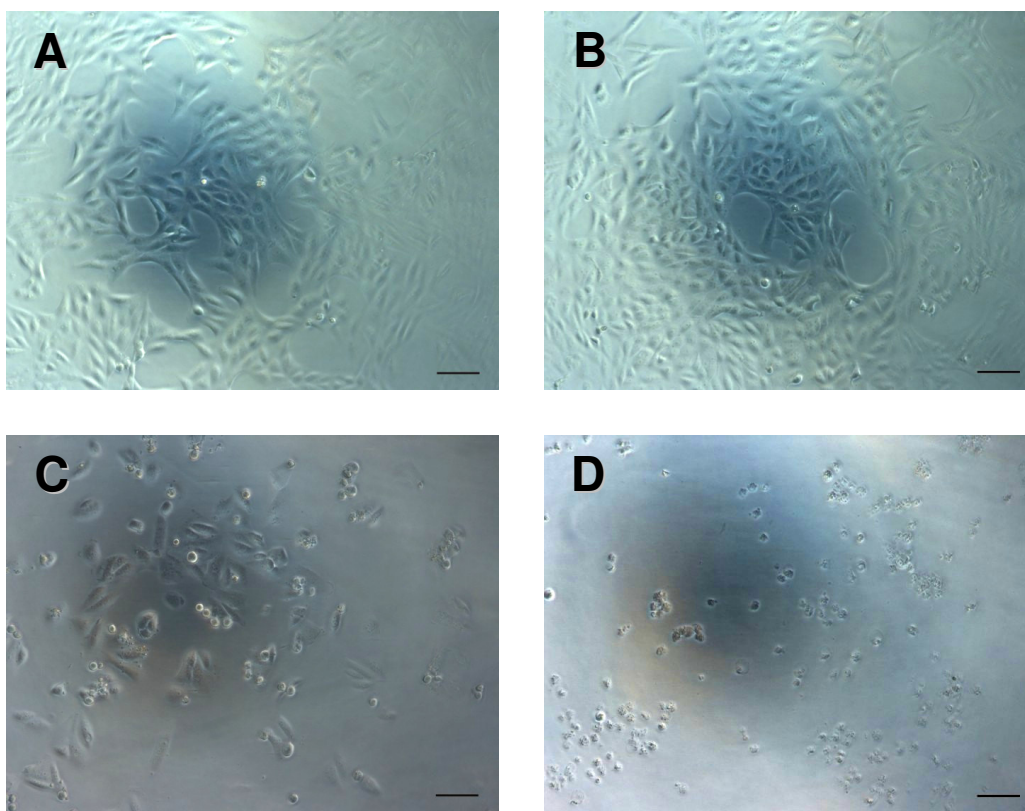


Figura 14 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular não tumoral **Vero**. **(A)** – População controlo, não exposta ao composto citotóxico; **(B)** – População teste exposta ao paclitaxel a 1×10^{-8} M; **(C)** – População teste exposta ao paclitaxel a 1×10^{-7} M; **(D)** – População teste exposta ao paclitaxel a 1×10^{-3} M. Barra de escala: 100 μ m.

Verificou-se que na linha celular Vero a representação gráfica da acção citotóxica do paclitaxel é muito semelhante nos ensaios de NR e SRB. No entanto, o método SRB surge como um método mais sensível, uma vez que a sua curva sigmoidal representa de modo mais preciso a análise morfológica das células, comparativamente à curva resultante do método NR (Figura 15).

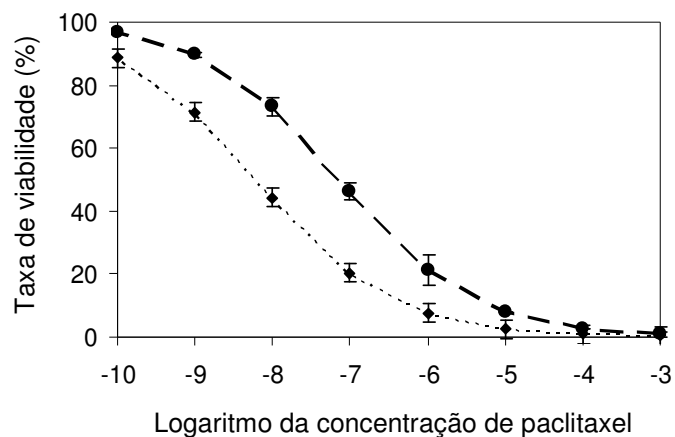


Figura 15 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, que traduz a taxa de viabilidade da linha celular não tumoral **Vero**, em função do logaritmo da concentração do paclitaxel. Ensaio NR \blacklozenge ; Ensaio SRB \bullet

4.3.1.6. Linha celular não tumoral FHs74 Int

Com base na análise microscópica da linha celular não tumoral FHs74 Int, comparativamente ao controlo (Figura 16A), as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M a 1×10^{-6} M (Figura 16B) apresentaram um crescimento e morfologia normais. Verificou-se que ocorreu a lise da maioria da população celular, quando exposta ao paclitaxel à concentração de 1×10^{-5} M (Figura 16C), ocorrendo mesmo a lise da totalidade das células, perante uma exposição ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-4} M e 1×10^{-3} M (Figura 16D).

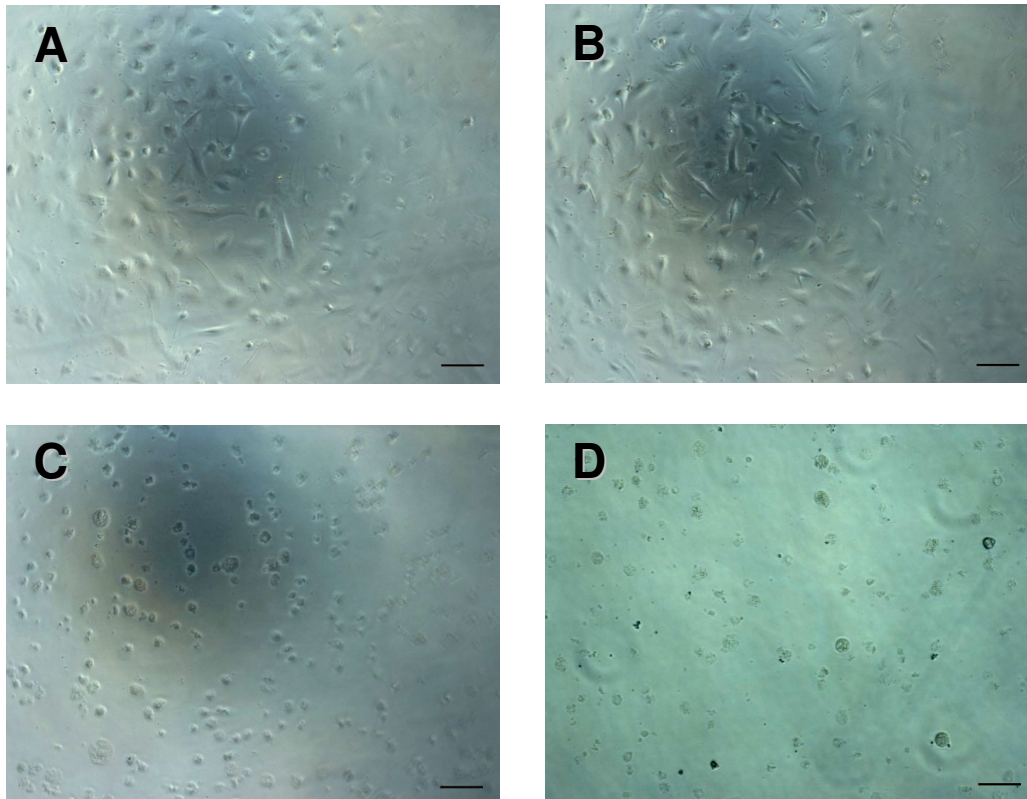


Figura 16 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição ao agente paclitaxel, da linha celular não tumoral **FHs74 Int**. **(A)** – População controlo, não exposta ao composto citotóxico; **(B)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-6} M; **(C)** – População teste exposta a paclitaxel a 1×10^{-5} M; **(D)** – População teste exposta ao paclitaxel a 1×10^{-3} M. Barra de escala: 100 μ m.

Verificou-se que na linha celular FHs74 Int a representação gráfica da acção citotóxica do paclitaxel é muito semelhante nos ensaios de NR e SRB. No entanto, o método SRB surge como um método mais sensível, uma vez que a sua curva sigmóidal representa de modo mais preciso a análise morfológica das células, que a curva resultante o método NR (Figura 17).

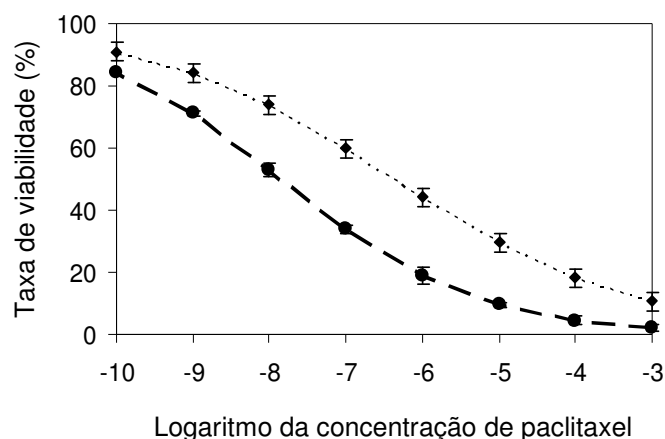


Figura 17 – Comparação da acção citotóxica do paclitaxel representada graficamente para os ensaios NR e SRB, que traduz a percentagem de viabilidade da linha celular não tumoral **FHs74 Int**, em função do logaritmo da concentração do paclitaxel. Ensaio NR $\text{---}\blacklozenge\text{---}$; Ensaio SRB $\text{---}\bullet\text{---}$.

Como base nos resultados obtidos verificou-se que o método NR traduz de modo pouco preciso a viabilidade celular. Por outro lado, o método SRB revelou uma elevada precisão na determinação da viabilidade celular e na quantificação colorimétrica, traduzindo-se num método rápido e estável, que permitiu a avaliação da actividade citotóxica do paclitaxel, com um elevado grau de sensibilidade. Concluiu-se portanto, que o método SRB é o ensaio de citotoxicidade mais adequado a utilizar na análise do potencial anti-tumoral do extracto de ciprosina.

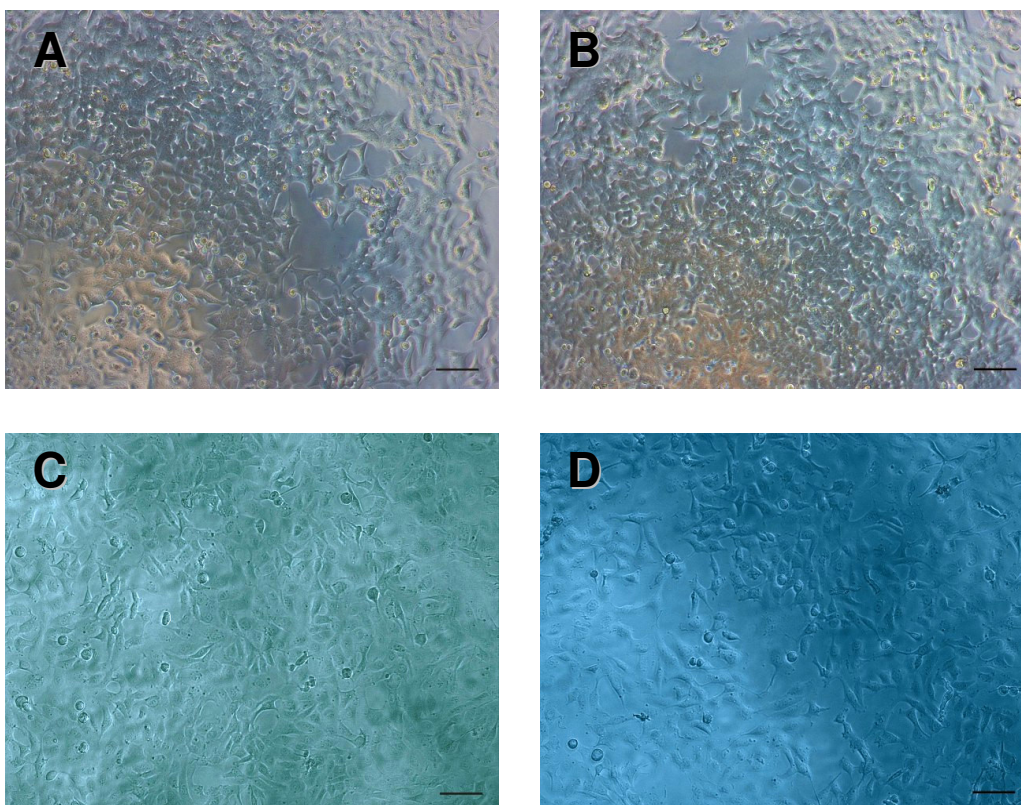
4.3.2. SULFORODAMINA B

4.3.2.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO TAMPÃO TRIS-EDTA

4.3.2.1.1. Avaliação microscópica do efeito citotóxico do tampão Tris-EDTA

O tampão fosfato é um tampão fisiológico, vulgarmente utilizado devido à sua concentração isotónica e por não ser tóxico para as células. No entanto, no presente trabalho o extracto de cipsosina não foi mantido num tampão fosfato, mas em tampão Tris-EDTA (TE). Deste modo, testou-se nas linhas celulares tumorais e não tumorais, o potencial citotóxico do tampão TE a diferentes concentrações, as quais mimetizam cada uma das diluições efectuadas a partir do *stock* do extracto de cipsosina.

Com base na análise morfológica das linhas celulares verificou-se que o tampão não provocou nas células em estudo qualquer alteração ao nível da morfologia e do crescimento, apresentando a população teste a mesma confluência e morfologia que a população controlo (Figura 18).



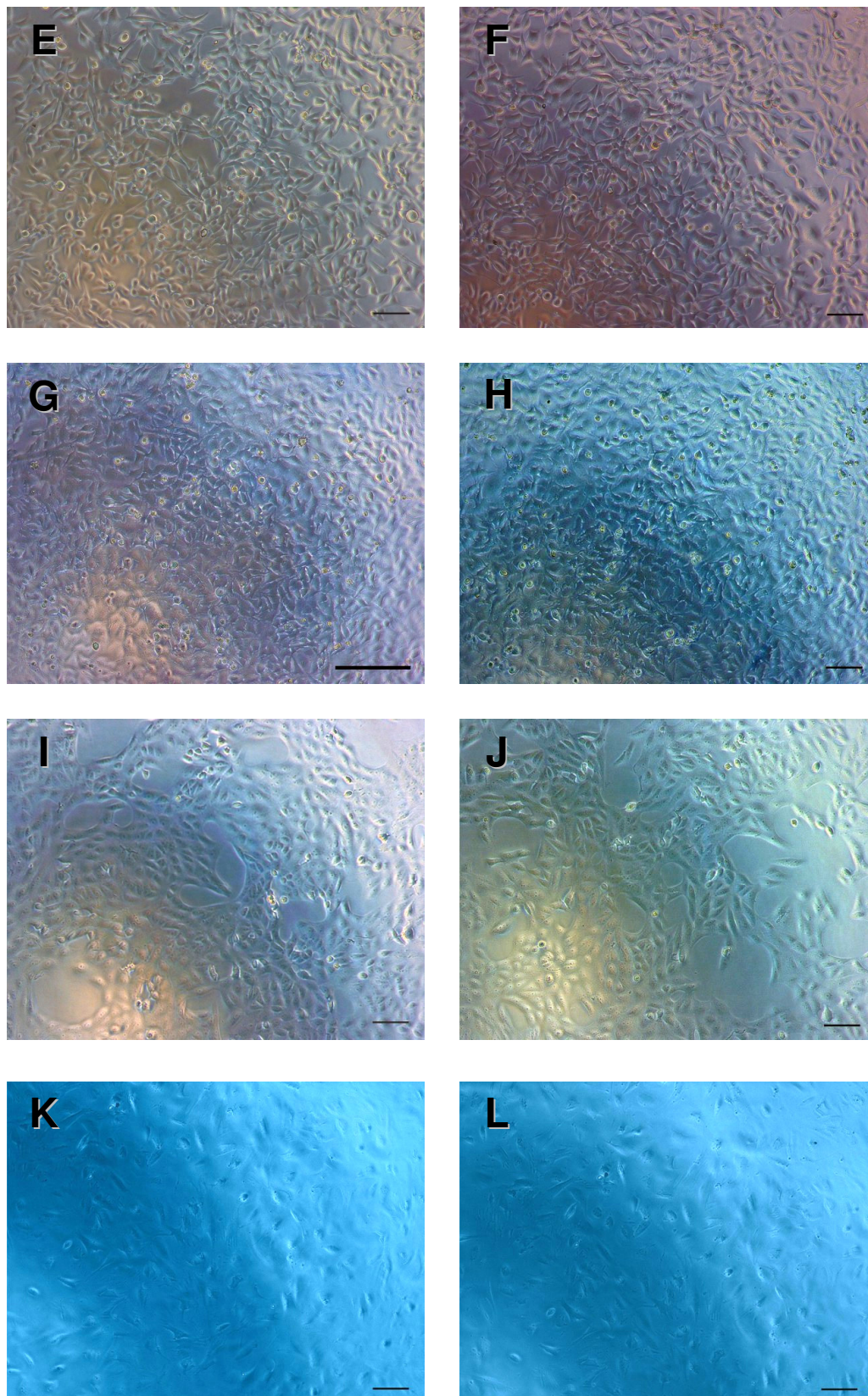


Figura 18 – Comparação entre a população controlo e a população submetida a 48 horas de exposição à concentração mais elevada do tampão TE (36 mM de Tris e 0,7 mM de EDTA). **(A)** População controlo da linha celular HCT116; **(B)** População teste da linha celular HCT116 submetida à concentração mais elevada do tampão TE; **(C)** População controlo da linha celular HT1080;

(D) População teste da linha celular HT1080 submetida à concentração mais elevada do tampão TE; (E) População controlo da linha celular TE671; (F) População teste da linha celular TE671 submetida à concentração mais elevada do tampão TE; (G) População controlo da linha celular Hela; (H) População teste da linha celular Hela submetida à concentração mais elevada do tampão TE; (I) População controlo da linha celular Vero; (J) População teste da linha celular Vero submetida à concentração mais elevada do tampão TE; (K) População controlo da linha celular FHs74 Int; (L) População teste da linha celular FHs74 Int submetida à concentração mais elevada do tampão TE. Barra de escala: 100 µm.

As fotos apresentadas referentes à população teste exposta à concentração mais elevada do tampão TE (36 mM de Tris e 0,7 mM de EDTA), são representativas das linhas celulares expostas às restantes concentrações do tampão, uma vez que não ocorreram alterações no crescimento e na morfologia das linhas celulares submetidas às restantes concentrações mais diluídas do tampão TE.

4.3.2.1.2. Avaliação espectrofotométrica do efeito citotóxico do tampão TE

A avaliação do efeito citotóxico do tampão TE terminou com a análise espectrofotométrica a 515 nm das linhas celulares coradas com SRB, submetidas às diferentes concentrações do tampão.

Os valores de absorvância obtidos para cada linha celular foram analisados de modo a determinar a percentagem de incorporação do corante SRB nas proteínas celulares (%SRB), para cada replicado das concentrações testadas do tampão TE, sendo a %SRB directamente proporcional à percentagem de viabilidade das células (Equação 2).

$$\%SRB = \frac{(SRB_T - SRB_B)}{(SRB_C - SRB_B)} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

De acordo com a equação (2), **SRB_T** representa a absorvância de cada replicado para cada concentração do agente potencialmente citotóxico, **SRB_B** a média da absorvância dos ensaios branco (meio de cultura sem células) e **SRB_C** representa a média da absorvância dos ensaios controlo (células cultivadas no respectivo meio de cultura, não expostas ao composto citotóxico).

Os valores analisados foram posteriormente introduzidos no programa de bioestatística *GraphPad Prism*[®] 5 (Version 5.01), no formato apropriado, ou seja, no eixo das abcissas

introduziram-se os valores do logaritmo de cada concentração do tampão TE, enquanto que no eixo das ordenadas introduziram-se os respectivos valores de %SRB de cada replicado (6 replicados para cada concentração analisada), previamente determinados.

Com base nos valores da taxa de viabilidade de cada linha celular, o programa *GraphPad Prism*[®] 5, visa representar graficamente a percentagem de viabilidade em função do logaritmo da concentração do agente citotóxico, utilizando a função de Hill (Equação 3), desde que exista pelo menos um valor de viabilidade igual ou inferior a 50% (Strickland *et al*, 2000).

A função de Hill representa um modelo logístico que traduz o efeito de um composto químico a determinada concentração numa população, sob a forma de uma representação gráfica sigmoide.

$$Y = \frac{\text{Fundo} + (\text{Topo} - \text{Fundo})}{1 + 10^{(\text{Log IC}_{50} - X) \times \text{Declive}}} \quad \text{Equação (3)}$$

De acordo com a função de Hill, traduzida pela equação 3, os parâmetros **Fundo** e **Topo** correspondem respectivamente a 0% e 100% de viabilidade celular, **Log IC₅₀** o logaritmo do parâmetro IC₅₀, **X** a concentração do composto citotóxico e **Declive** representa o declive da Função de Hill.

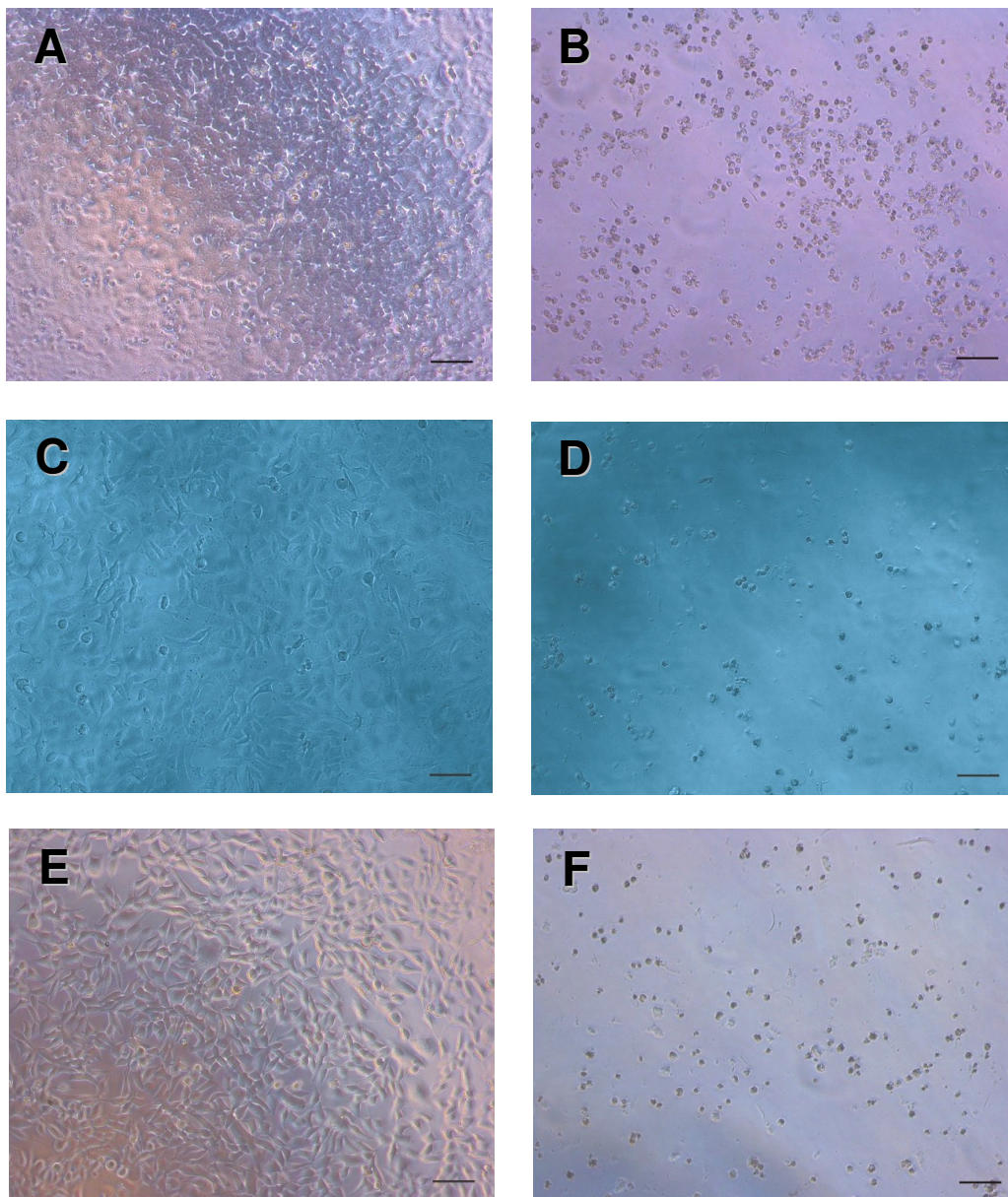
No entanto, o programa de bioestatística *GraphPad Prism*[®] 5 não permitiu a determinação dos parâmetros que constituem a função de Hill necessários ao cálculo do IC₅₀ (parâmetro que traduz a concentração do composto citotóxico, à qual se verifica uma redução de 50% de crescimento e viabilidade celulares), uma vez que todas as linhas celulares submetidas a 48 horas de exposição ao tampão TE, apresentaram uma elevada percentagem de viabilidade para todas as concentrações do tampão, e teria sido necessário obter pelo menos um valor de viabilidade igual ou inferior a 50%, como anteriormente referido.

Deste modo, verificou-se que o tampão TE não apresentou qualquer efeito citotóxico sobre as linhas celulares em estudo, pelo que o extracto de ciprosona a utilizar em futuros estudos poder-se-à apresentar em soluções de tampão TE.

4.3.2.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRACTO DE CIPROSINA

4.3.2.2.1. Avaliação microscópica do efeito citotóxico do extracto ciprosina em tampão TE

De acordo com a análise microscópica das linhas celulares em estudo, verificou-se que o extracto de ciprosina em tampão TE às concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ manifestou uma actividade citotóxica. Nas linhas celulares tumorais e não tumorais submetidas ao extracto de ciprosina a 1000 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu a lise da totalidade da população celular (Figura 19).



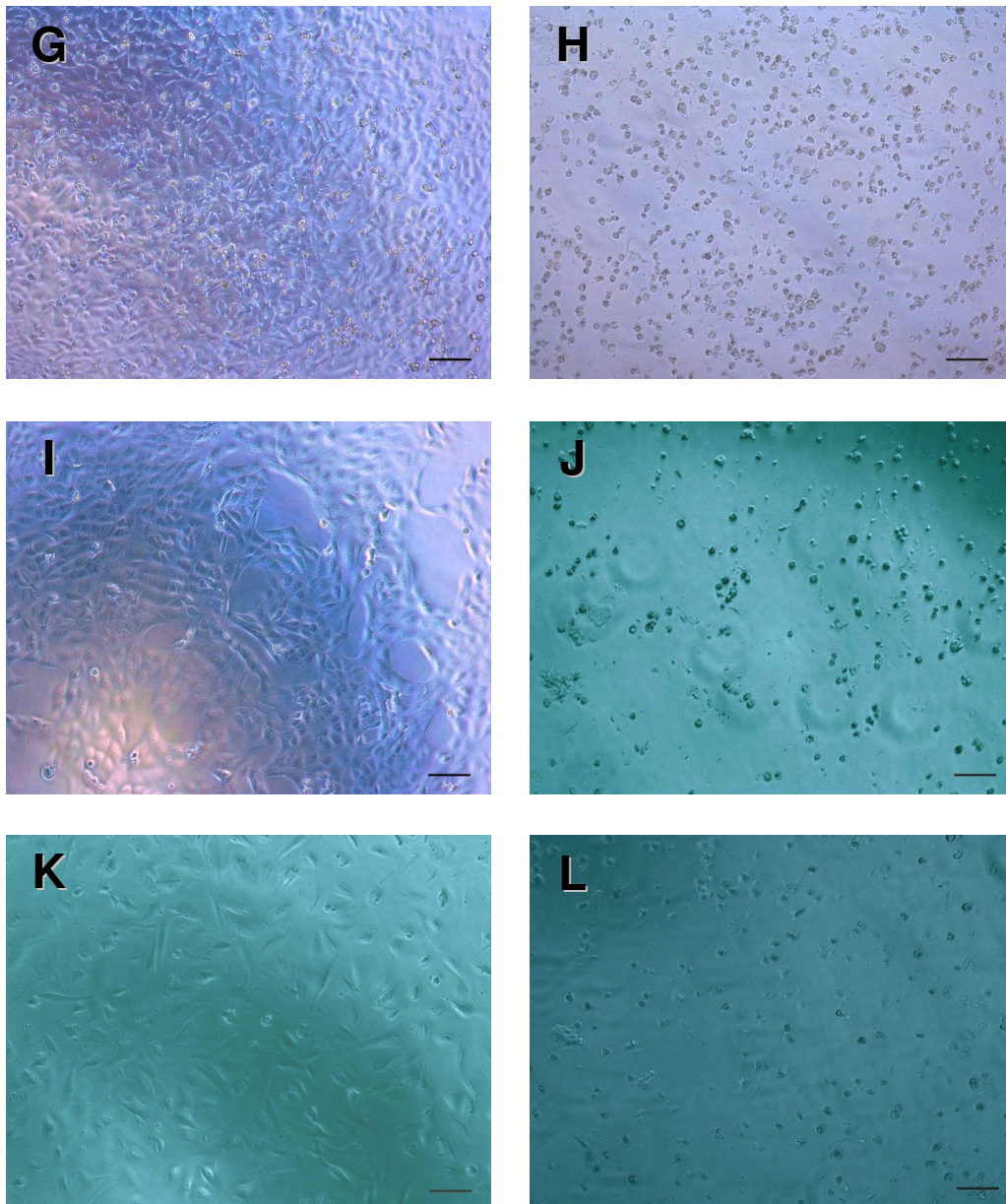
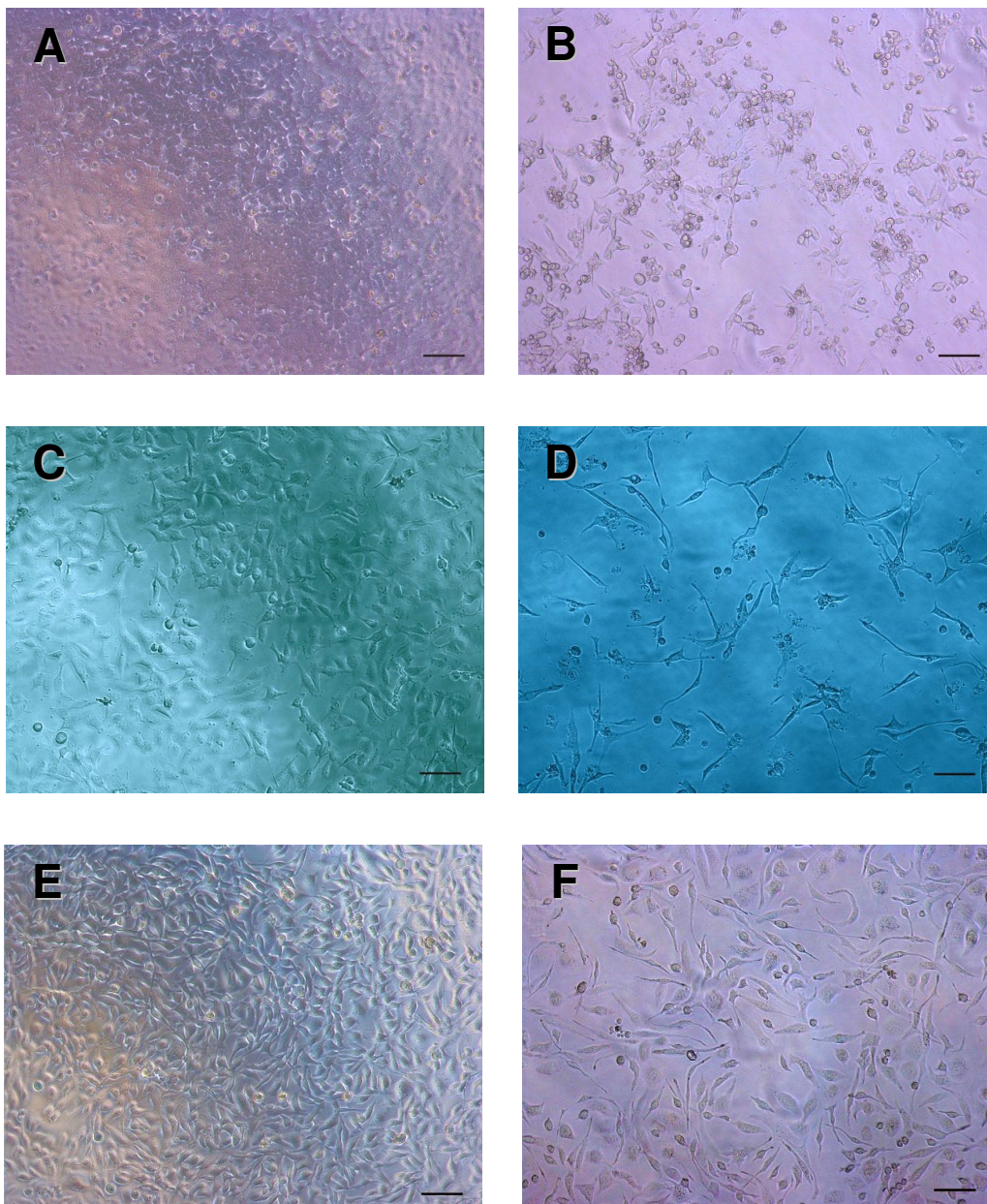


Figura 19 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida ao extracto de ciproosina à concentração de 1000 µg/mL.

(A) e (B) População controlo e população teste, respectivamente, da linha celular tumoral **HCT116**;
(C) e (D) População controlo e população teste, respectivamente, da linha celular tumoral **HT1080**;
(E) e (F) População controlo e população teste, respectivamente, da linha celular tumoral **TE671**;
(G) e (H) População controlo e população teste, respectivamente, da linha celular tumoral **HeLa**;
(I) e (J) População controlo e população teste, respectivamente, da linha celular não tumoral **Vero**;
(K) e (L) População controlo e população teste, respectivamente, da linha celular não tumoral **FHS74Int**.
Barra de escala: 100 µm.

O extracto de ciprosina a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, provocou alterações morfológicas em todas as linhas celulares tumorais estudadas, apresentando-se as células mais esticadas e fusiformes, tendo sido também detectados sinais de lise. O efeito citotóxico do extracto manifestou-se também com o decréscimo do crescimento das linhas celulares tumorais, comparativamente à população celular controlo (Figuras 20A a 20H).

Nas linhas celulares não tumorais submetidas à mesma concentração do extracto de ciprosina, não foram verificadas alterações significativas na morfologia nem no crescimento celular, apresentado a população teste uma confluência de 80 a 90%, tal como a população controlo (Figuras 20I a 20L).



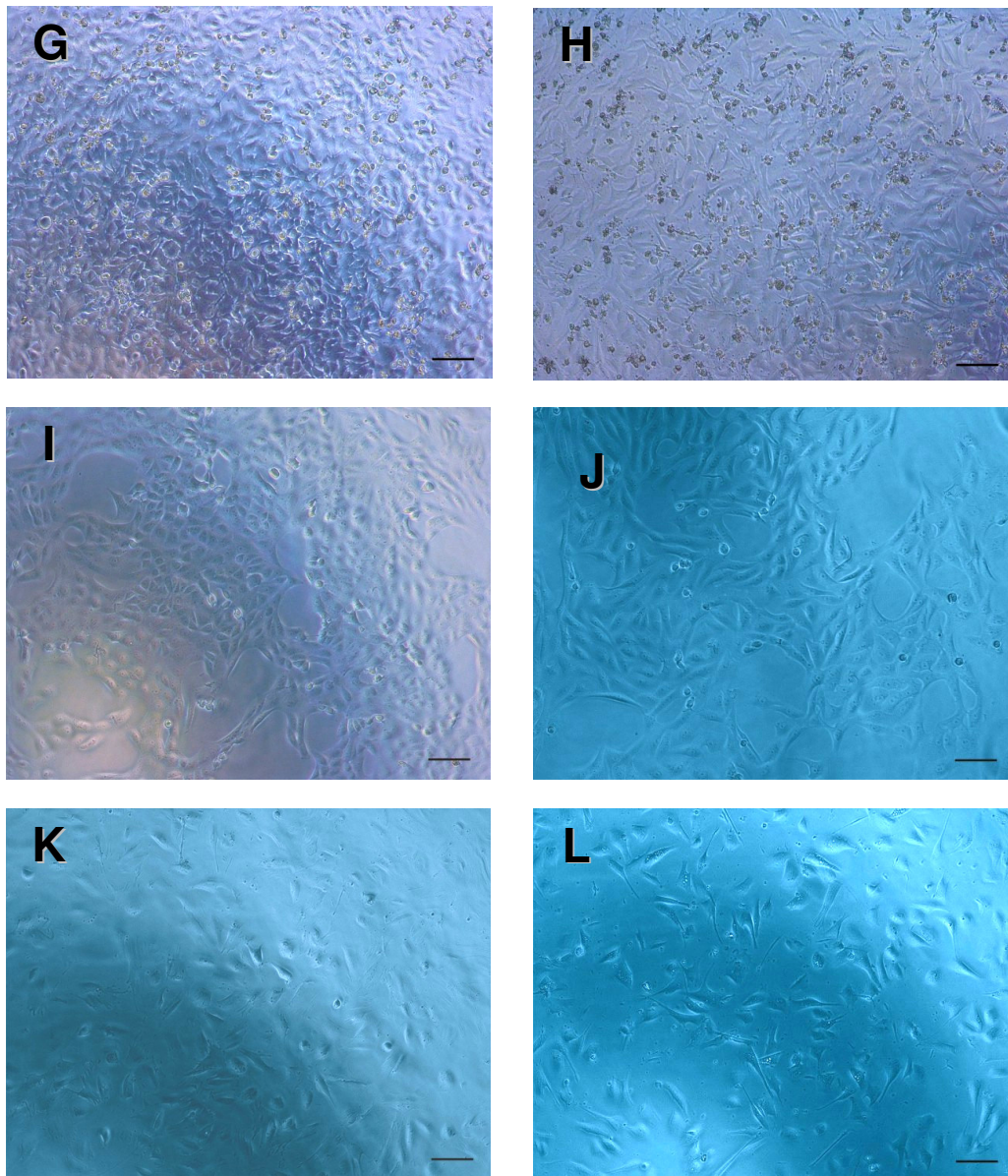


Figura 20 – Comparação entre a população controlo e a população teste submetida ao extracto de ciproquina à concentração de 100 µg/mL.

(A) e (B) População controlo e população teste respectivamente, da linha celular **HCT116**;
(C) e (D) População controlo e população teste respectivamente, da linha celular **HT1080**;
(E) e (F) População controlo e população teste respectivamente, da linha celular **TE671**;
(G) e (H) População controlo e população teste respectivamente, da linha celular **HeLa**;
(I) e (J) População controlo e população teste respectivamente, da linha celular **Vero**;
(K) e (L) População controlo e população teste respectivamente, da linha celular **FHS74 Int.**
Barra de escala:100 µm

O extracto de ciprosina preparado nas concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL, não revelou qualquer tipo de efeito citotóxico sobre as linhas celulares tumorais e não tumorais em estudo, apresentando as células uma morfologia e crescimento normais, não tendo sido verificados quaisquer sinais de lise celular.

4.3.2.2.2. Avaliação espectrofotométrica do efeito citotóxico do extracto de ciprosina

A avaliação do efeito citotóxico do extracto de ciprosina culminou com a análise espectrofotométrica a 515 nm das linhas celulares coradas com SRB, submetidas à preparação de ciprosina a diferentes concentrações, nomeadamente 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL (Anexo III).

Ao quantificar o corante incorporado nas células, determinou-se a viabilidade celular e consequentemente o grau de citotoxicidade do extracto vegetal, que se traduz na determinação do parâmetro IC_{50} , que traduz a concentração do composto citotóxico, à qual se verifica uma redução de 50% de crescimento e viabilidade celulares.

Os valores de absorvância obtidos para cada linha celular foram analisados de modo a determinar através da referida Equação 2, a percentagem de incorporação do corante SRB nas proteínas celulares (%SRB), para cada replicado das concentrações testadas de ciprosina, sendo a %SRB directamente proporcional à percentagem de viabilidade das células.

Os valores de absorvância foram analisados do mesmo modo que os dados do efeito do tampão TE. Uma vez que nas linhas celulares em estudo, se determinaram valores iguais e inferiores a 50% de viabilidade, o programa *GraphPad Prism*[®] 5 permitiu a representação gráfica da percentagem de viabilidade em função do logaritmo da concentração do extracto de ciprosina, utilizando a função de Hill (Figura 21).

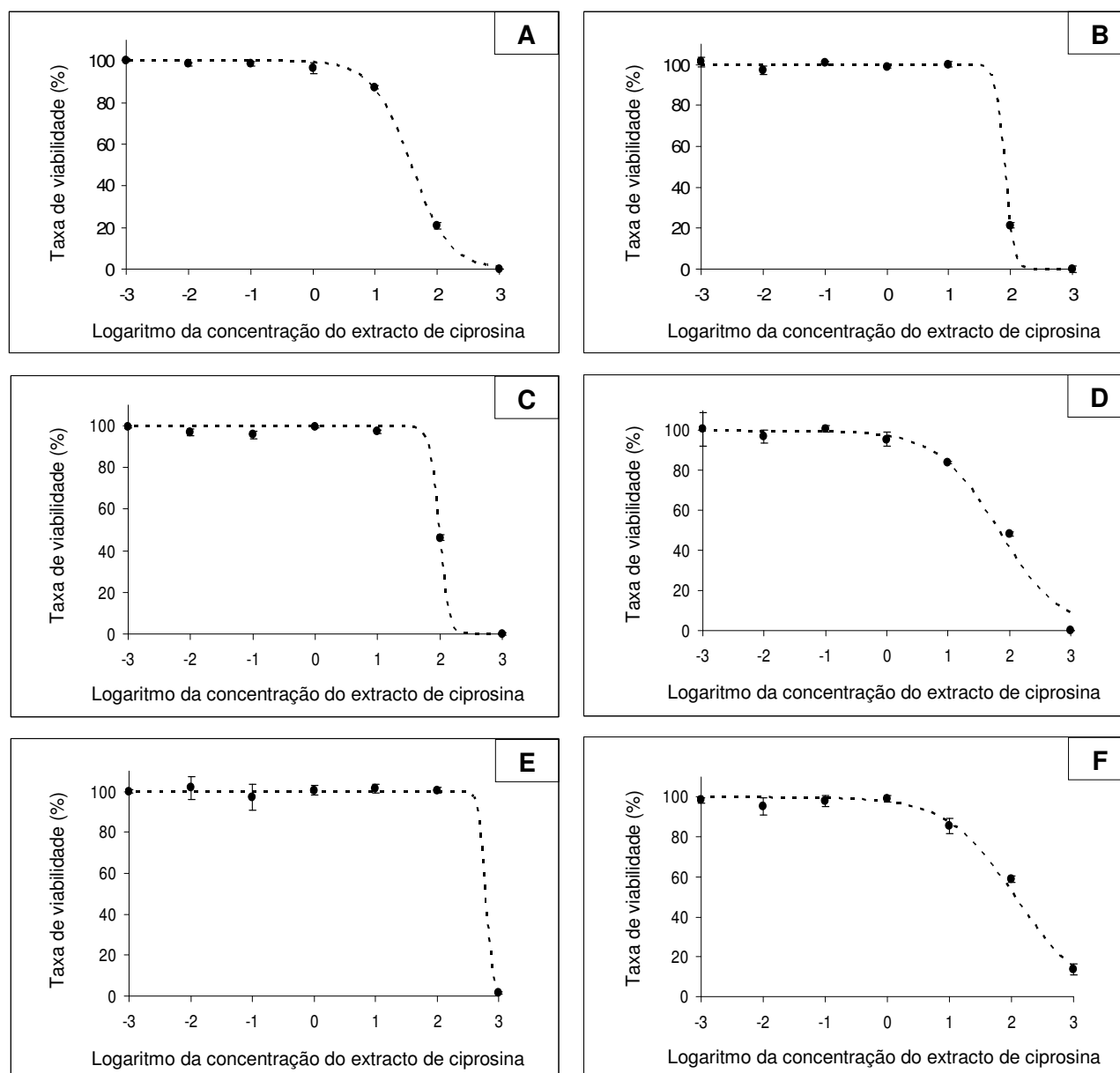


Figura 21 – Representação gráfica da Função *Hill*, que traduz a taxa de viabilidade de células coradas com SRB em função do logaritmo da concentração do extracto de ciprofloxacin. **(A)** – Linha celular tumoral HCT116; **(B)** – Linha celular tumoral HT1080; **(C)** – Linha celular tumoral TE671; **(D)** – Linha celular tumoral Hela; **(E)** – Linha celular não tumoral Vero; **(F)** – Linha celular não tumoral FHs74 Int.

Através do programa de bioestatística *GraphPad Prism*[®] 5 determinaram-se os parâmetros que constituem a função de Hill, necessários ao cálculo do IC₅₀, de modo a determinar a concentração à qual o extracto de ciprosina inibe em 50% a proliferação celular (Tabela VI).

Tabela VI – Valores do parâmetro IC₅₀, que traduzem a concentração do extracto de ciprosina, que inibe em 50% a proliferação celular tumoral e não tumoral.

	Designação	IC₅₀ (µg/mL)
Linhas celulares tumorais	HCT116	38,6
	HT1080	81,1
	TE671	97,5
	Hela	69,7
Linhas celulares não tumorais	Vero	617,8
	FHs74 Int	118,5

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as linhas celulares tumoral e não tumoral mais resistentes à acção do extracto de ciprosina foram, respectivamente, as linhas TE671 e Vero, sendo a linha tumoral HCT116 a que apresentou maior sensibilidade ao extracto de ciprosina.

Estabelecendo uma comparação entre as linhas celulares HCT116 e FHs74 Int, verificou-se que a linha tumoral é mais sensível ao extracto de ciprosina que a linha não tumoral, apresentando um valor de IC₅₀ igual a 38,6 µg/mL. Enquanto que na linha não tumoral FHs74 Int apenas se manifestou o efeito do extracto de ciprosina à concentração de 118,5 µg/mL. Em conclusão, a linha tumoral mais sensível à ciprosina, linha celular HCT116, apresenta uma sensibilidade três a dezasseis vezes superior à das linhas não tumorais, respectivamente FHs74 Int e Vero.

5. DISCUSSÃO

A Ciência tem vindo a desenvolver inúmeras terapias contra o cancro, no intuito de controlar a patologia, que surge como um conjunto de doenças que partilham um problema subjacente comum, a proliferação celular desregulada que interfere com as funções vitais do organismo.

O esforço a longo prazo na investigação de novas terapias tem evoluído consideravelmente ao longo dos anos. De todas as estratégias de terapia do cancro, a quimioterapia surge como o método mais correntemente utilizado. No entanto, a utilização de fármacos ou produtos químicos anti-tumorais, é uma terapia pouco específica e tóxica para as células normais do hospedeiro (Allen, T., 2002).

Actualmente, ao assistirmos cada vez mais a um aumento da mortalidade devida ao cancro, existe a necessidade de se desenvolverem novas estratégias para o combate desta grave patologia. Nesse sentido, diversos estudos adicionais e complementares têm conduzido ao desenvolvimento de novos fármacos anti-tumorais, dos quais se destacam os compostos de origem vegetal, como o paclitaxel, que surge como uma importante ferramenta no tratamento de diferentes tipos de cancro.

O desenvolvimento de novas terapias, recorrendo a compostos de elevado valor terapêutico, isolados de plantas utilizadas na manufactura de produtos alimentares, surge como um método de tratamento, cujo conhecimento ainda não está totalmente explorado, mas representa um campo promissor no combate ao cancro.

Apesar dos estudos já desenvolvidos sobre a planta do cardo, *Cynara cardunculus*, vulgarmente conhecida na dieta alimentar devido às suas propriedades coagulantes, antioxidantes e anti-hepatotóxicas, ainda existe uma grande lacuna no conhecimento das propriedades anti-tumorais da planta.

Nesse sentido, o presente trabalho permitiu avaliar o potencial anti-tumoral do extracto de cipsosina, extraído da planta do cardo, como agente terapêutico contra alguns tipos de cancro, assim como estabelecer os valores do parâmetro IC₅₀ para a determinação da janela terapêutica.

A caracterização por SDS-PAGE permitiu confirmar que a cipsosina é constituída por duas subunidades de diferentes pesos moleculares, nomeadamente a subunidade maior que apresenta um peso molecular aparente de cerca de 31 kDa e a subunidade menor que possui cerca de 14 kDa. O resultado obtido comprova a informação bibliográfica existente, segundo a qual a cipsosina é constituída por uma subunidade grande com um peso molecular aparente de 31.0 a 34.0 kDa e por uma subunidade pequena de 14.0 a 18.0 kDa (Sampaio *et al.*, 2008).

No presente trabalho determinou-se previamente o método de citotoxicidade mais apropriado para a avaliação da acção anti-tumoral do extracto vegetal. Uma vez que o método de citotoxicidade a ser utilizado, deve ser adequado ao que se pretende avaliar, escolheram-se os métodos de Incorporação de Vermelho Neutro (NR) e Sulforrodamina B

(SRB) por permitirem avaliar simultaneamente a viabilidade e a proliferação celulares, após exposição a uma concentração determinada do composto citotóxico em estudo.

Para ambos os ensaios, utilizou-se como agente anti-tumoral o paclitaxel, por ser um composto vegetal de propriedades anti-tumorais, cujo conhecimento do seu mecanismo de acção é bastante vasto e completo.

Os métodos de citotoxicidade NR e SRB têm a vantagem de serem desenvolvidos em placas de cultura de 96 poços, o que permitiu testar em simultâneo diversas concentrações de paclitaxel. Ambos os ensaios permitiram também uma avaliação por microscopia e por espectrofotometria resultando, respectivamente, numa análise das diferenças morfológicas, assim como numa análise quantitativa colorimétrica do corante incorporado nas células, após uma exposição a diferentes concentrações do agente citotóxico.

Com base nos resultados obtidos através dos ensaios de NR e SRB, verificou-se que o paclitaxel provocou alterações morfológicas nas células de todas as linhas celulares em estudo, nomeadamente, as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080, TE671 e Hela, assim como nas linhas celulares não tumorais, Vero e FHs74 Int.

Nas linhas celulares tumorais, as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M, apresentaram um crescimento e morfologia normais, não tendo sido detectados quaisquer sinais de lise. Por sua vez, as células submetidas à acção do paclitaxel às concentrações de 1×10^{-8} M a 1×10^{-6} M, apresentaram-se mais pequenas, redondas, sendo detectada uma significativa redução do crescimento celular, comparativamente à população celular controlo. Verificou-se que em todas as linhas tumorais, o efeito citotóxico máximo do paclitaxel foi sentido às concentrações de 1×10^{-5} M a 1×10^{-3} M, uma vez que ocorreu a lise da maioria da população celular testada.

Na linha celular não tumoral Vero, apenas foram detectadas alterações morfológicas nas células expostas ao paclitaxel à concentração de 1×10^{-7} M. O efeito citotóxico manifestou-se com uma redução do tamanho das células, apresentando estas uma forma mais arredondada, tendo sido também detectado um decréscimo do crescimento celular da população teste, em comparação à população controlo. Na linha celular Vero não foram observados quaisquer sinais de lise.

Na linha celular não tumoral FHs74 Int, a acção do agente citotóxico apenas foi sentida à concentração de 1×10^{-5} M, perante a qual foram detectados sinais de lise, ocorrendo mesmo a lise da totalidade da população celular às concentrações de 1×10^{-4} M a 1×10^{-3} M.

Perante a avaliação morfológica das células, seria de esperar que, nos ensaios de NR e SRB, a análise espectrofotométrica e a consequente representação gráfica da acção citotóxica do paclitaxel fosse representativa dos resultados observados ao nível da morfologia e do crescimento celular.

Fazendo uma abordagem mais pormenorizada, na linha celular tumoral HCT116 as células expostas ao paclitaxel às concentrações de 1×10^{-10} M e 1×10^{-9} M apresentaram um crescimento e morfologia normais. Seria portanto de esperar que a estas concentrações, as

células apresentassem uma elevada taxa de viabilidade. No entanto, segundo o ensaio de NR as células expostas à concentração de 1×10^{-9} M, apresentaram uma taxa de viabilidade muito baixa, inferior a 20%, o que traduz o baixo nível de sensibilidade do método NR.

Na linha tumoral HT1080, o método de NR também traduziu uma reduzida sensibilidade na quantificação colorimétrica. Cerca de 90% da população teste submetida à acção do paclitaxel à concentração de 1×10^{-8} M apresentou a membrana celular muito fragilizada, tendo sido detectados muitos fragmentos resultantes da lise celular. Seria portanto de esperar, que a taxa de viabilidade a esta concentração fosse quase nula. Apenas o ensaio de SRB determinou com a máxima sensibilidade o resultado obtido.

Na linha celular tumoral Hela, o resultado da análise espectrofotométrica, traduziu novamente de forma clara a diferença de sensibilidade dos métodos NR e SRB, uma vez que apenas o ensaio de SRB descreveu a representação gráfica do efeito citotóxico, resultante da quantificação colorimétrica, de acordo com os resultados da análise microscópica.

Nas linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int, verificou-se que o método de SRB apresenta uma elevada sensibilidade na determinação da viabilidade celular e na quantificação colorimétrica, uma vez que a representação gráfica sigmoide traduziu de modo mais preciso a análise morfológica das células, comparativamente à curva resultante do método NR.

Estabelecendo uma comparação entre os dois métodos de citotoxicidade, verificou-se que o ensaio de SRB é o método mais preciso, consistentemente mais estável e portanto mais adequado para este tipo de avaliação de citotoxicidade, em que é essencial que as análises morfológicas e espectrofotométricas sejam complementares e concordantes.

O facto dos resultados do ensaio de NR serem pouco precisos e induzirem respostas incorrectas, corrobora o estudo desenvolvido por Weyermann *et al.* (2005). Segundo estes autores, o ensaio de NR, apesar de ter a vantagem de ser um método económico e de execução relativamente simples, tem a desvantagem ser um método de reduzida precisão e instável com o decorrer do tempo.

O resultado obtido confirma os estudos defendidos pelo *National Cancer Institute* (NCI). Segundo a comunidade científica do NCI, entre os vários ensaios de citotoxicidade *in vitro*, o ensaio de SRB destaca-se como um método rápido, de análise colorimétrica, indefinidamente estável, que providencia a avaliação da actividade citotóxica de uma determinada substância, com um elevado grau de sensibilidade. O método de SRB, para além de ser optimizado para o uso de microplacas, normalmente em formato de 96 poços, está particularmente bem adaptado para ensaios em grande escala, no estudo pré-clínico de substâncias citotóxicas (Skehan *et al.*, 1990).

A sensibilidade do método de SRB é comparável à de alguns corantes fluorescentes, como a fluoresceína e superior à dos convencionais corantes visíveis, como o bromocresol púrpura. Apesar do ensaio de SRB ser essencialmente desenvolvido para culturas celulares aderentes, é também adequado para culturas celulares em suspensão, assim como para linhas celulares com um crescimento em monocamada, fracamente aderentes (Rubinstein *et al.*, 1989).

Perante a informação bibliográfica que reforça os resultados obtidos, concluiu-se que o método de SRB é o ensaio de citotoxicidade mais adequado para a análise do potencial anti-tumoral do extracto do ciprosona.

Segundo Lanigan e Yamarik (2002) o EDTA pode actuar como agente citotóxico, impedindo o aparecimento de novas divisões mitóticas. Nesse sentido, como o extracto de ciprosona foi preparado em tampão Tris-EDTA (TE), testou-se o potencial citotóxico do tampão TE a diferentes concentrações, as quais mimetizaram cada uma das diluições efectuadas a partir do *stock* do extracto de ciprosona.

Com base na análise morfológica das linhas celulares verificou-se que o tampão TE não provocou nas células em estudo qualquer alteração ao nível da morfologia e do crescimento, apresentando a população teste a mesma confluência e morfologia que a população controlo. Concluiu-se que o tampão TE não apresentou qualquer efeito citotóxico sobre as linhas celulares em estudo, pelo que o extracto de ciprosona a utilizar em futuros estudos poder-se-à apresentar em soluções de tampão TE.

Com base nos resultados da análise do potencial anti-tumoral do extracto de ciprosona pelo método de citotoxicidade SRB, verificou-se que o extracto de ciprosona às concentrações de 1000 µg/mL e 100 µg/mL manifestou uma actividade citotóxica em todas as linhas celulares estudadas, nomeadamente as linhas tumorais HCT116, HT1080, TE671 e Hela, assim como as linhas não tumorais Vero e FHs74 Int.

Em todas as linhas celulares tumorais e não tumorais a acção máxima do extracto de ciprosona foi sentida à concentração de 1000 µg/mL, uma vez que após a exposição ao extracto vegetal ocorreu a lise da totalidade da população celular.

Por sua vez, o extracto de ciprosona preparado às concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL, não revelou qualquer efeito citotóxico sobre as linhas celulares tumorais e não tumorais em estudo, apresentando as células uma morfologia e crescimento normais.

Estabelecendo uma comparação entre os resultados da análise morfológica e da análise espectrofotométrica, considera-se que das concentrações testadas do extracto de ciprosona, a concentração de 100 µg/mL poderá estar na base de uma terapia anti-tumoral.

À concentração referida, o extracto vegetal provocou alterações morfológicas em todas as linhas celulares tumorais, apresentando-se as células fusiformes e com a membrana celular fragilizada, tendo sido também detectados sinais de lise. O efeito citotóxico do extracto manifestou-se também com o decréscimo do crescimento das linhas celulares tumorais, comparativamente à população celular controlo.

Por sua vez, nas linhas celulares não tumorais submetidas à mesma concentração do extracto de ciprosona, não foram verificadas alterações significativas na morfologia nem no crescimento celulares, apresentado a população teste uma confluência de 80 a 90%, tal como a população controlo.

A avaliação do efeito citotóxico do extracto de cipsosina, através da análise por espectrofotometria, permitiu quantificar a viabilidade celular e o grau de citotoxicidade do extracto vegetal, que se traduziu na determinação do parâmetro IC₅₀.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as linhas celulares tumorais são mais sensíveis que as linhas celulares não tumorais, à acção do extracto de cipsosina.

Das linhas celulares tumorais estudadas destaca-se a linha celular HCT116, caracterizada por células epiteliais isoladas do carcinoma do cólon humano, destacando-se também a linha celular não tumoral FHs74 Int, caracterizada por células epiteliais isoladas do intestino humano.

O cancro do cólon consiste no quarto tipo de cancro mais comum a nível mundial, com estimativas que apontam para o aparecimento de cerca de 780 mil casos por ano. Segundo as estatísticas, mais de 360 mil doentes na Europa Ocidental desenvolvem por ano cancro do cólon, o que corresponde a cerca de mil novos casos por dia (Jemal *et al.*, 2005).

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), o cancro cólon-rectal representa 14,6% do total de mortalidade oncológica em Portugal. Actualmente assiste-se a um consistente aumento da mortalidade devido a este tipo de cancro, não se descortinando qualquer indício de interrupção desta tendência. Estima-se que em Portugal existam mais de 5500 novos casos por ano, e que por dia morram dez pessoas vítimas deste tipo de carcinoma.

Perante os dados estatísticos, não restam dúvidas que o cancro do cólon constitui um grave e actual problema de saúde. Nesse sentido, justifica-se que no presente trabalho, a análise dos resultados obtidos seja maioritariamente centrada na sensibilidade da linha tumoral HCT116 ao efeito citotóxico do extracto de cipsosina, face à resistência das células da linha não tumoral FHs74 Int.

A acção do extracto de cipsosina foi detectada entre as concentrações de 1000 µg/mL e 100 µg/mL, salientando-se que as linhas celulares HCT116 e FHs74 Int após uma exposição a 100 µg/mL do extracto vegetal apresentaram respostas diferentes.

As células da linha tumoral apresentaram-se mais fusiformes e muito fragilizadas, apresentaram um crescimento mais reduzido, ocorrendo mesmo a lise da maioria da população celular. Por sua vez, as células da linha não tumoral não apresentaram qualquer alteração ao nível da morfologia e do crescimento.

Estabelecendo uma razão entre os valores do parâmetro IC₅₀ das linhas celulares HCT116 (IC₅₀ = 38,6 µg/mL) e FHs74 Int (IC₅₀ = 118,5 µg/mL), verificou-se que as células HCT116 são três vezes mais sensíveis que as células FHs74 Int, o que traduz uma eventual eficácia da citotoxicidade do extracto de cipsosina sobre linhas celulares tumorais, sem prejudicar de forma acentuada linhas celulares não tumorais.

Os ensaios de citotoxicidade desenvolvidos *in vitro* demonstraram a capacidade do extracto de cipsosina, a determinada concentração (100 µg/mL), inibir o crescimento celular de linhas celulares tumorais. Deste modo, a capacidade do composto induzir a inibição do crescimento de células tumorais em cultura *in vitro*, é considerada como uma indicação do

potencial do composto citotóxico como agente terapêutico *in vivo* contra o cancro (Lieberman *et al.*, 2001).

A análise da citotoxicidade do extracto de cipsosina, desenvolvida no presente trabalho, surge como um estudo complementar ao trabalho desenvolvido por Miadokova e colaboradores (2008). Segundo estes autores, o extracto isolado da planta do cardo, revelou possuir propriedades anti-mutagénicas e anti-oxidantes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), bactérias (*Salmonella typhimurium*) e plantas (*Vicia sativa*).

O presente trabalho demonstrou portanto que, para além das propriedades anti-oxidantes e anti-mutagénicas estudadas por Nadova *et al.* 2007, o extracto de cipsosina possui também propriedades anti-tumorais.

Segundo Khalil e El-Adaway (1994), elevadas concentrações de saponinas, presentes nos extractos da planta do cardo, provocam danos na membrana celular, induzindo mesmo a morte celular por apoptose.

Por sua vez, outra visão científica revela que a acção conjunta de todos os constituintes da planta do cardo, nomeadamente flavonóides, ácido cafeoilquínico, triterfenóides e saponinas, aparenta conferir uma actividade citotóxica ao extracto da planta do cardo. O estudo desenvolvido teve como base a avaliação das propriedades inibidoras do extracto proteico, em células de leucemia humanas (HL-60) e de murino (L1210), através da análise da cinética de crescimento celular e da detecção electroforética dos ácidos nucleicos. Os resultados demonstraram uma significativa redução do crescimento celular das células expostas ao extracto proteico da planta à concentração de 500 µg/mL, ocorrendo mesmo a morte celular por apoptose, perante uma exposição das células a 2500 µg/mL do extracto proteico (Nadova *et al.*, 2007).

No presente trabalho, os resultados obtidos demonstraram que o extracto de cipsosina a 100 µg/mL, provocou uma significativa alteração morfológica e redução do crescimento das células tumorais expostas, ocorrendo mesmo a morte celular da totalidade da população quando exposta a 1000 µg/mL do extracto de cipsosina.

A análise de citotoxicidade desenvolvida no presente trabalho, demonstrou que o potencial anti-tumoral do extracto vegetal tem como base a sua actividade anti-proliferativa, assim como a sua capacidade de induzir alterações morfológicas e morte celular.

Os resultados obtidos traduzem a importância do trabalho desenvolvido, que contribui para o conhecimento científico das propriedades anti-tumorais do extracto de cipsosina, o qual demonstra ser uma valiosa potencial estratégia terapêutica para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos para o combate do cancro.

6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento sobre as propriedades anti-tumorais da planta do cardo é ainda muito escasso. Deste modo, o presente trabalho realizado com o objectivo de avaliar o potencial anti-tumoral do extracto de cipsosina, como terapia contra alguns tipos de cancro, permitiu obter as seguintes conclusões:

- O método de SRB é o ensaio mais adequado para a avaliação da citotoxicidade do extracto de cipsosina, extraído da planta do cardo;

- O extracto de cipsosina na concentração de 1000 µg/mL provoca a lise da maioria da população celular de linhas tumorais e não tumorais;

- Quando expostas a 100 µg/mL de extracto de cipsosina as diferentes linhas celulares apresentam diferentes capacidades de resistência;

- As linhas celulares tumorais estudadas são mais sensíveis que as linhas celulares não tumorais à acção citotóxica do extracto de cipsosina;

- O potencial anti-tumoral do extracto de cipsosina manifestou-se de forma mais acentuada na linha celular tumoral HCT116;

- A linha celular tumoral HCT116 ($IC_{50} = 38,6 \mu\text{g/mL}$) é três vezes mais sensível que a linha celular não tumoral FHS74 Int ($IC_{50} = 118,5 \mu\text{g/mL}$) e dezasseis vezes mais sensível que a linha não tumoral Vero ($IC_{50} = 617,8 \mu\text{g/mL}$), o que traduz uma eventual eficácia da citotoxicidade do extracto de cipsosina sobre as linhas celulares tumorais, sem prejudicar de forma acentuada as linhas celulares não tumorais;

- As propriedades anti-tumorais do extracto de cipsosina aparentam ser mais adequadas à terapia do cancro do cólon;

- A concentração do extracto de cipsosina a cerca de 100 µg/mL pode estar na base de uma terapia anti-tumoral;

- O potencial anti-tumoral do extracto de cipsosina manifestou-se pela sua capacidade de induzir alterações morfológicas, inibir o crescimento celular e induzir morte celular.

Os conhecimentos adquiridos com o presente estudo poderão ser futuramente aprofundados, nomeadamente no que diz respeito a:

- Estudar o mecanismo de acção da ciprosina, ao avaliar se o extracto de ciprosina, a determinada concentração, induz morte celular por apoptose através da análise da libertação da proteína citocromo *c* e da activação da via das caspases;

- Realizar ensaios *in vivo* usando o modelo animal de ratos portadores de carcinoma do cólon de origem humana, nos quais serão realizados ensaios de citotoxicidade, usando extracto de ciprosina;

- Avaliar os animais, ao nível dos parâmetros morfométricos e sinais comportamentais, após administração de determinadas concentrações do extracto de ciprosina;

- Após a última administração, realizar o sacrifício dos animais para avaliação das lesões. Avaliar todos os órgãos e tecidos que apresentem desvios relativamente à sua morfologia, sendo todas as lesões avaliadas do ponto de vista da sua dimensão e localização;

- Analisar todos os órgãos e tecidos pela técnica de histologia, utilizando técnicas de coloração padronizadas;

- Produzir recombinantemente ciprosina através de uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, modificada geneticamente para a produção heteróloga da proteinase aspártica;

- Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o potencial anti-tumoral da ciprosina recombinante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, T. M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews – Cancer*, 2: 750-763;

Andreeff, M.; Goodrich, D. W.; Pardee, A. (2000). Cell proliferation, differentiation and apoptosis. Holland-Frei Cancer Medicin 5th edition. B.C. Decker Publisher, Atlanta, Georgia;

Azevedo, C. (1999). *Biologia Celular e Molecular*. 3.^a Edição, Lidel, Edições técnicas, Lisboa;

Beaujouin, M.; Baghdiguan, S.; Glondu-Lassis, M.; Berchem, G.; Liaudet-Coopman, E. (2006). Over expression of both catalytically active and inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity. *Oncogene*, 25:1967-1973;

Beers, E. P.; Bonnie, J. W.; Zhao, C. (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, 44: 399-415;

Bell, G. I. (1976). Models of carcinogenesis as an escape from mitotic inhibitors. *American Association for the Advancement of Science*, 192: 569-572;

Belozersky, M. A.; Sarbakanova, S. T.; Dunaevsky, Y. E. (1989). Aspartic proteinase from wheat seeds—isolation, properties and action on gliadin. *Planta Journal*, 177: 321–326;

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*. 72: 248-254;

Brodelius, P. E.; Cordeiro, M. C.; Pais, M. S. (1995). Aspartic proteinases (cyprosins) from *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* cv. cardon; purification, characterization and tissue-specific expression. *Advances in experimental medicine and biology*, 362: 255-266;

Carvalho, A. V.; Ribeiro, M.; Gonçalves, P.; Cruz, P.; Cruz, H. (2005). Composições farmacêuticas contendo extractos de *Thymus mastichina* e sua utilização em terapias anticancerígenas. Patente Nacional N.º 103334;

Chen, F.; Foolad, M. R. (1997). Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic proteinase and specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Molecular Biology*, 35: 821–831;

Cordeiro, C.; Pais, M. S.; Brodelius, P. (1994). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, 92: 645-653;

Cordeiro, C.; Pais, M. S.; Brodelius, P. (1998). *Cynara cardunculus* subsp. *Flavescens* (Cardoon): *In vitro* culture and the production of cyprosin – milk – clotting enzymes. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 41. Medicinal and Aromatic Plants (Y. P. S. Bajaj Editor);

Costa, J.; Ashford, D. A.; Nimtz, M.; Bento, I.; Frazão, C.; Esteves, C. L.; Faro, C. J.; Kervinen, J.; Pires, E.; Veríssimo, P.; Wlodawer, A.; Carrondo, M. (1997). The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *European Journal of Biochemistry*, 243: 695-700;

Cragg, G. M. (2002). Natural product drug discovery and development: The United States National Cancer Institute Role. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 21: 97-111;

Davies, D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review Biophysics Chemistry*, 19: 189-215;

Deiss, L. P.; Galinka, H.; Berissi, H.; Cohen, O.; Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell induced by interferon- γ , FAS/APO-1 e TNF- α . *EMBO Journal*, 15: 3861-3870;

Dent, P., Yacoub, A., Grant, S., Curiel, D. T., Fisher, P. B. (2005). Prospects: MDA-7/IL-24 regulates proliferation, invasion and radiosensitivity: a new cancer therapy? *Journal of Cell Biochemistry*, 95: 712-719;

Dervan, P. A. (1999). *Understanding Cancer: A scientific and clinical guide for the layperson*. McFarland & Company Editor, 208pp;

Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemistry Review*, 102: 4431-4458;

Egas, C.; Lavoura, N.; Resende, R.; Brito, R.; Pires, E.; Lima, M.; Faro, C. (2000). The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (49): 38190-38196;

Fadeel, B.; Orrenius, S. and Zhitovskiy, B. (1999). "Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?" *Biochemistry Biophysical Research Communications*, 266(3): 699-717;

Frazão, C.; Bento, I.; Costa, J.; Soares, C.; Veríssimo, P.; Faro, C.; Pires, E.; Cooper, J.; Carrondo, M. (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus L.* *The Journal of Biological Chemistry*, 39: 27694-27701;

Funchs, D. A.; Johnson, R. K. (1978). "Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison". *Cancer Treatment Reports*, 62: 1219-1222.

Goldsby, R.; Hays, L.; Chen, X.; Olmsted, E.; Slayton, W.; Spangrude, G. (2002). High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase δ proofreading. *Proceedings of National Academy of Sciences*, Vol. 99, 15560-15565

Guruprasad, K.; Tormakangas, K.; Kervinen, J.; Blundell, T. L. (1994). Comparative modelling of barley-grain aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity. *Federation of Biochemical Societies*, 352: 131-136;

Huber, R.; Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts of Chemical Research*, 11: 114-122

Jemal, A.; Taylor, M.; Ward, E.; Samuels, A.; Tiwari, R. C.; Ghafoor, A.; Feuer, E. J.; Thun, M. J. (2005). Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 55: 10-30;

Khalil, A. H.; El-Adaway, T. A. (1994). Isolation, identification and toxicity of saponins from different legumes. *Food Chemistry*, 50: 197-201;

Kervinen, J.; Törmäkangas, K.; Runeberg-Roos, P.; Guruprasad, K.; Blundell, T.; Teeri, T.H. (1995). Structure and possible function of the aspartic proteinases in barley and other plants. Takahashi, K. Editor. *Aspartic Proteinases: structure, function, biology and biomedical implications*. Plenum Press, New York, 241-254;

Křižková, L.; Mučaji, P.; Nagy, M.; Krajčovič, J. (2004). Triterpenoid cynarasaponins from *Cynara cardunculus L.* reduce chemically induced mutagenesis *in vitro*. *Phytochemistry Journal*, 11: 673-678;

Lanigan, R. S.; Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of EDTA, calcium disodium EDTA, diammonium EDTA, dipotassium EDTA, disodium EDTA, TEA-EDTA, tetrasodium EDTA, tripotassium EDTA, trisodium EDTA, HEDTA, and trisodium HEDTA. *International Journal of Toxicology*, 21 (2): 95-142;

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology*, 10: 447-455;

Lee, K. (2000). Research and future trends in the pharmaceutical development of medicinal herbs from Chinese Medicine. *Public Health Nutrition*, 3 (4A): 515-522;

Leist, M.; Jaattela, M (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8): 589-98.

Lieberman, M.; Patterson, G.; Moore, R. (2001). In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Letters*, 173: 21-29;

Lowry, O.H.; Rosbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951) Lowry Protein Assays. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265;

Macedo, A. C.; Malcata, F. X.; Oliveira, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: A review. *Journal of Dairy Science*, 76(6): 1725-1739;

Macedo, I. Q.; Faro, C. J.; Pires, E. V. (1996) Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine α - and β -casein and comparison with chymosin, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 44: 42-47;

Martins, A. P. L. (1999). A flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.) como agente coagulante no fabrico de queijo. Caracterização e influência dos processos de conservação na actividade coagulante. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia (ISA) para prestação de provas de doutoramento em Engenharia Agro-Industrial;

Miadokova, E.; Nadova, S.; Vlckova, V.; Duhova, V.; Kopaskova, M.; Cipak, L.; Rauko, P.; Mucaji, P.; Grancai, D. (2008). Antigenotoxic effect of extract from *Cynara cardunculus* L. *Phytotherapy Research*, 22: 77-81;

Mutlu, A.; Gal, S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum*, 105: 569-576;

Nadova, S.; Miadokova, E.; Mucaji, P.; Grancai, D.; Cipak, L. (2007). Growth inhibitory effect of ethyl acetate-soluble fraction of *Cynara cardunculus* L. in leukaemia cells involves cell cycle arrest, cytochrome c release and activation of caspases. *Phytotherapy research*, 10.1002: 2263;

Panavas, T.; Pikla, A.; Reid, P. D.; Rubinstein, B.; Walker, E. L. (1999). Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Molecular Biology*, 40: 237-248;

Peltier, S.; Oger, J.-M.; Lagarce, F.; Couet, W.; Benoît, J. P. (2006). Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. *Pharmaceutical Research*, 23(6): 1243-1250;

Pettit, G. R.; Pierson, F. H.; Herald, C. L. (1994). *Anticancer Drugs from Animals, Plants and Microorganisms*. New York, John Wiley & Sons Publishers;

Picon, A.; Gaya, P.; Medina, M.; Nuñez, M. (1997). Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for ripening. *Biotechnology Letters*, 19(4): 345-348;

Piwnica, D.; Touraine, P.; Struman, I.; Tabruyn, S.; Bolbach, G.; Clapp, C.; Joseph, A.; Kelly, P.; Goffin, V. (2004). Cathepsin D Processes Human Prolactin into Multiple 16K-Like N-Terminal Fragments: Study of Their Antiangiogenic Properties and Physiological Relevance. *Molecular Endocrinology*, 18(10): 2522-2542;

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3396-3402;

Rao, M. B.; Tanksale, A. P.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3): 597-635;

Rawlings, N. D.; Barret, A. J. (1995). Families of aspartic peptidases and those of unknown catalytic mechanism. *Methods of Enzymology*; 248: 105-120;

Rawlings, N. D.; Morton, F. R.; Barrett, A. J. (2006). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 34: D270-D272;

Romanova, D.; Vachalkova, A.; Cipak, L.; Ovesna, Z.; Rauko, P. (2001). Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma*, 48: 104-107;

Roseiro, L. B.; Viala, D.; Besle, J. M. (2005). Preliminary observations of flavonoid glycosides from the vegetable coagulant *Cynara cardunculus* L. in protected designation of origin cheeses. *International Dairy Journal*, 15: 579-584;

Rubinstein, L. V.; Paull, K. D.; Shoemaker, R. H. (1989). Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. *Proceedings of American Association for Cancer Research*, 30: 607;

Pais, M.; Sampaio, P.; Soares, R.; Coelho, M.; Santos, J.; Cruz, P.; Cruz, H. (2007). Composições farmacêuticas contendo a enzima cipsosina, uma peptidase aspártica de *Cynara cardunculus*, e sua inclusão em formulações antitumorais. Número de submissão de Patente Nacional: 20071000042729, Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Portugal;

Sampaio, P. N.; Fortes, A. M.; Cabral, J. M. S.; Pais, M. S.; Fonseca, L. P. (2008). Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4): 305-312;

Simões, I.; Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2067-2075;

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 82 (13): 1107-1110;

Soares, R.; Dinis, T. C. P.; Cunha, A. P.; Almeida, L. M. (1997). Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, 26: 469-478;

Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50-69;

Strickland, J.; Paris, M.; Raabe, H.; Haseman, J.; Casati, S.; Clothier, R.; Cao, C.; Crockett, P.; Tice, R.; Stokes, W. (2000). Data collection and analysis for an *in vitro* cytotoxicity validation study. National Institute of Environment Health Sciences, 01: 4499;

Valentão, O.; Fernandes, E.; Carvalho, F. (2002). Antioxidant properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 4989-4893;

Veríssimo, P.; Faro, C.; Moir, A.; Lin, Y.; Tang, J.; Pires, E. (1996). Purification characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *European Journal of Biochemistry*, 235: 762-768;

Wani, M.; Taylor, H.; Wall, M.; Coggon, P.; McPhail, A. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemistry Society*, 93(9): 2325-2327;

Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288: 369-376.

8. PÁGINAS DE INTERNET DE BASES DE DADOS

Análise estatística – Instituto Nacional de Estatística (INE): <http://www.ine.pt>

Companhia científica – ATCC: <http://www.lgcpromochem-atcc.com>

Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América – *National Cancer Institute*:
<http://www.cancer.gov/>

Plantas e tratamento de cancro – *Cyberbotanica*: <http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/>

Peptidases – MEROPS: <http://www.merops.ac.uk>

ANEXO I – SOLUÇÕES E REAGENTES

- **Solução de azul de Tripano a 0,4% (m/v)**

Para 100 mL:

Dissolveram-se 0,4 g de azul de tripano em 100 mL de tampão fosfato-salino (1x) sem cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (PBS 1x). Armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

- **Solução de azul de Tripano a 0,1% (m/v)**

Para 100 mL:

Adicionaram-se 25 mL de solução de azul de tripano a 0,4% em 75 mL de PBS 1x. Filtrou-se a solução com filtros de 0,2 µm de porosidade para remover impurezas e precipitados e armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

- **Solução de ácido acético a 1% (v/v)**

Para 1000 mL:

Adicionaram-se 10 mL de ácido acético a 990 mL de água ultra pura. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

- **Solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M**

Para 100 mL:

Adicionaram-se 4,9 mL de HCl a 37% (m/v) a 95,1 mL de água ultra pura. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

- **Solução corante de Vermelho Neutro (NR) a 25 µg/mL**

A solução deverá ser preparada 24 horas antes da sua utilização.

Para 100 mL:

Dissolver 2,5 g de corante Vermelho Neutro (NR) em 100 mL do respectivo meio de cultura das linhas celulares estudadas. Filtrou-se a solução com filtros de 0,2 µm de porosidade e armazenou-se a solução a 37 °C, protegida da luz.

- **Solução de remoção da solução corante de NR**

Solução preparada no momento.

Para 100 mL:

Misturaram-se 50 mL de etanol absoluto com 50 mL de água ultra pura e 1 mL de ácido acético glacial e perpez-se o volume para 100 mL com água ultra pura.

- **Tris Base (Trishidroximetilaminometano) a 10 mM**

Para 1000 mL:

Dissolveram-se 1,2 g de Tris em 1000 mL de água ultra pura. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

- **Solução de Sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (m/v)**

Solução preparada no momento.

Para 100 mL:

Dissolveram-se 0,4 g de corante sulforrodamina B (SRB) em 100 mL de ácido acético a 1%. Filtrou-se a solução com filtros de 0,2 µm de porosidade.

- **Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (p/v)**

Solução preparada no momento.

Para 100 mL:

Dissolveram-se 50 g de ácido tricloroacético (TCA) em 100 mL de água ultra pura. Após completa dissolução colocou-se a solução a 4 °C, de modo a ser usada a frio.

- **Tampão Tris-EDTA (Tris a 50 mM e EDTA a 1 mM)**

Para 100 mL:

Dissolveram-se 0,6 g de Trishidroximetilaminometano (Tris) e 0,0292 g de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) em 100 mL de água ultra pura. Ajustou-se o pH da solução para 8.3 com ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M. Por fim, filtrou-se a solução com filtros de 0,2 µm de porosidade e armazenou-se a 4 °C.

ANEXO II – TÉCNICAS

• Tripsinização

A técnica de tripsinização consiste em libertar as células aderentes ao suporte de cultura, através da adição de uma protease designada de Tripsina a 0,25%, suplementada com ácido etilenodiaminotetraacético (Tripsina-EDTA).

A tripsina-EDTA hidrolisa as ligações peptídicas na extremidade C-terminal, sendo específica para ligações peptídicas que contêm os aminoácidos lisina e arginina (Huber e Bode, 1978).

A técnica de tripsinização compreende as seguintes etapas: **(1)** Remover o meio sobrenadante do suporte de cultura, T₂₅; **(2)** Lavar a superfície de cultura, à qual estão aderentes células, com 1 mL de tampão fosfato-salino (1x) sem cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (PBS 1x), de modo a remover o soro do meio de cultura, que permaneceu no T₂₅; **(3)** Adicionar 1 mL de Tripsina-EDTA a 0,25% (p/v); **(4)** Após as células ficarem em suspensão, inibir a acção da protease por adição de 4 mL do respectivo meio de cultura, contendo Soro Fetal Bovino (FBS), de cada linha celular; **(5)** Homogeneizar a suspensão celular e retirar uma alíquota para contagem do número de células pelo método de exclusão do azul de tripano.

• Método de exclusão do azul de tripano

O método de exclusão do azul de tripano é um método rápido e simples de contagem do número de células viáveis e mortas.

O azul de tripano é um corante que permite a distinção entre células viáveis e células mortas, ou seja, as células viáveis por possuírem a membrana celular intacta não incorporam o corante, enquanto as células mortas por possuírem a membrana celular fragilizada incorporam o corante, ficando conseqüentemente coradas de azul.

A alíquota da suspensão celular é previamente diluída com azul tripano, por observação microscópica contam-se as células nas duas câmaras de um hemacitómetro (Câmara de Neubauer), num total de 32 quadrados. O número de células contadas deve ser superior a 100 para aumentar a grau de confiança da amostragem.

Com base no número de células contadas determina-se a concentração de células viáveis (Equação 1), assim como a percentagem de viabilidade (Equação 2).

$\text{Concentração de células} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{N.º quadrados}} \times \text{Factor diluição} \times \text{Factor de correcção do hemacitómetro}$	Equação 1
$\text{Percentagem de viabilidade} = \frac{\text{Células viáveis totais}}{\text{Total de células viáveis} + \text{Total de células mortas}} \times 100$	Equação 2

ANEXO III – VALORES DE ABSORVÂNCIAS• **Avaliação da citotoxicidade do paclitaxel pelo ensaio Vermelho Neutro (NR)**

Tabela I – Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos poços **Branco** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Branco das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,377	0,261	0,243	0,261	0,281	0,192
0,349	0,231	0,220	0,209	0,338	0,180
0,362	0,219	0,248	0,227	0,325	0,173
0,318	0,213	0,257	0,219	0,308	0,175
0,309	0,263	0,231	0,249	0,316	0,174
0,296	0,233	0,261	0,207	0,317	0,174
0,29	0,209	0,224	0,238	0,340	0,189
0,339	0,244	0,242	0,225	0,310	0,187
0,304	0,206	0,209	0,204	0,323	0,164
0,337	0,271	0,240	0,202	0,321	0,150
0,393	0,208	0,256	0,248	0,330	0,178
0,398	0,243	0,265	0,209	0,317	0,165
0,388	0,242	0,202	0,202	0,334	0,162
0,322	0,228	0,274	0,463	0,314	0,167
0,369	0,232	0,272	0,132	0,341	0,161
0,353	0,289	0,246	0,501	0,356	0,162
0,29	0,209	0,232	0,209	0,234	0,180
0,318	0,231	0,265	0,234	0,265	0,198
0,349	0,234	0,251	0,231	0,246	0,182
0,393	0,265	0,246	0,265	0,261	0,175
0,369	0,246	0,209	0,234	0,223	0,132
0,353	0,261	0,251	0,246	0,221	0,187
0,345	0,251	0,231	0,265	0,273	0,198
0,304	0,209	0,209	0,246	0,231	0,176
0,304	0,265	0,234	0,261	0,234	0,165
0,341	0,246	0,265	0,223	0,265	0,167
0,322	0,234	0,246	0,221	0,251	0,182
0,300	0,265	0,261	0,273	0,209	0,182
0,342	0,251	0,251	0,251	0,231	0,198
0,321	0,209	0,209	0,209	0,234	0,182
0,322	0,242	0,242	0,231	0,265	0,187
0,351	0,242	0,221	0,221	0,246	0,163
0,327	0,221	0,222	0,273	0,261	0,175
0,367	0,222	0,221	0,234	0,223	0,187
0,342	0,221	0,222	0,273	0,221	0,198
0,361	0,222	0,221	0,251	0,241	0,176

Tabela II – Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos poços **Controlo** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Controlo das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,501	0,501	0,526	0,666	0,648	0,455
0,515	0,515	0,486	0,674	0,547	0,468
0,543	0,543	0,532	0,647	0,519	0,461
0,505	0,505	0,556	0,598	0,588	0,498
0,490	0,490	0,560	0,648	0,584	0,488
0,518	0,518	0,480	0,797	0,588	0,482
0,561	0,561	0,511	0,615	0,648	0,461
0,548	0,548	0,547	0,529	0,698	0,458
0,557	0,557	0,523	0,583	0,694	0,459
0,600	0,600	0,521	0,635	0,660	0,466
0,511	0,511	0,473	0,671	0,712	0,474
0,482	0,482	0,535	0,617	0,787	0,469

Tabela III – Valores de absorvância obtidos a 540 nm para a linha celular tumoral **HCT116**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Teste da linha celular HCT116 para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,306	0,264	0,226	0,289	0,308	0,348	0,372	0,536
0,313	0,261	0,196	0,324	0,348	0,315	0,379	0,524
0,342	0,255	0,227	0,292	0,308	0,317	0,362	0,544
0,323	0,251	0,246	0,304	0,341	0,346	0,364	0,553
0,311	0,258	0,224	0,292	0,296	0,317	0,337	0,473
0,285	0,251	0,222	0,298	0,309	0,316	0,365	0,514

Tabela IV – Valores de absorvância obtidos a 540 nm para a linha celular tumoral **HT1080**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Teste da linha celular HT1080 para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,306	0,264	0,226	0,289	0,308	0,348	0,372	0,536
0,313	0,261	0,196	0,324	0,348	0,315	0,379	0,524
0,342	0,255	0,227	0,292	0,308	0,317	0,362	0,544
0,323	0,251	0,246	0,304	0,341	0,346	0,364	0,553
0,311	0,258	0,224	0,292	0,296	0,317	0,337	0,473
0,285	0,251	0,222	0,298	0,309	0,316	0,365	0,514

Tabela V – Valores de absorvância obtidos a 540 nm para a linha celular tumoral **TE671**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Teste da linha celular TE671 para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,183	0,232	0,315	0,368	0,405	0,493	0,470	0,507
0,228	0,256	0,298	0,363	0,382	0,536	0,480	0,547
0,182	0,230	0,324	0,373	0,388	0,451	0,396	0,486
0,187	0,240	0,295	0,434	0,484	0,440	0,444	0,507
0,182	0,221	0,335	0,472	0,404	0,544	0,379	0,510
0,187	0,259	0,335	0,389	0,370	0,551	0,461	0,537

Tabela VI – Valores de absorvância obtidos a 540 nm para a linha celular tumoral **Hela**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Teste da linha celular Hela para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,285	0,468	0,373	0,437	0,359	0,484	0,575	0,655
0,388	0,434	0,367	0,376	0,44	0,394	0,496	0,641
0,202	0,355	0,382	0,387	0,427	0,425	0,545	0,661
0,287	0,434	0,354	0,455	0,373	0,302	0,507	0,612
0,355	0,399	0,318	0,446	0,376	0,388	0,532	0,661
0,252	0,447	0,319	0,434	0,481	0,441	0,448	0,541

Tabela VII – Valores de absorvância obtidos a 540 nm para a linha celular não tumoral **Vero**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Teste da linha celular Vero para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,495	0,476	0,474	0,477	0,362	0,635	0,586	0,672
0,37	0,156	0,424	0,316	0,389	0,544	0,548	0,578
0,379	0,235	0,217	0,371	0,331	0,536	0,493	0,489
0,448	0,391	0,374	0,401	0,433	0,577	0,481	0,605
0,312	0,238	0,166	0,223	0,309	0,475	0,539	0,583
0,16	0,346	0,169	0,253	0,248	0,419	0,435	0,611

Tabela VIII – Valores de absorvância obtidos a 540 nm para a linha celular não tumoral **FHs74 Int**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 540 nm nos Poços Teste da linha celular FHs74 Int para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,181	0,251	0,215	0,345	0,333	0,387	0,385	0,494
0,184	0,247	0,218	0,310	0,353	0,371	0,376	0,476
0,185	0,258	0,225	0,350	0,396	0,371	0,393	0,477
0,183	0,249	0,219	0,357	0,304	0,387	0,382	0,493
0,185	0,259	0,189	0,369	0,395	0,388	0,381	0,462
0,187	0,243	0,230	0,353	0,348	0,380	0,381	0,471

• **Avaliação da citotoxicidade do paclitaxel pelo ensaio Sulforrodamina B (SRB)**

Tabela IX – Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos poços Branco para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Branco das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,069	0,050	0,056	0,045	0,057	0,061
0,062	0,049	0,044	0,051	0,065	0,065
0,056	0,051	0,052	0,053	0,067	0,080
0,058	0,048	0,046	0,052	0,049	0,067
0,059	0,052	0,060	0,053	0,047	0,098
0,060	0,052	0,045	0,051	0,050	0,074
0,059	0,058	0,049	0,050	0,046	0,066
0,065	0,049	0,057	0,052	0,044	0,055
0,043	0,046	0,052	0,059	0,046	0,046
0,044	0,055	0,051	0,047	0,050	0,043
0,048	0,060	0,052	0,054	0,044	0,044
0,047	0,061	0,062	0,066	0,044	0,049
0,046	0,055	0,056	0,055	0,048	0,058
0,046	0,047	0,054	0,059	0,043	0,048
0,055	0,059	0,053	0,061	0,051	0,052
0,044	0,052	0,051	0,069	0,048	0,049
0,065	0,056	0,058	0,053	0,054	0,062
0,062	0,053	0,052	0,056	0,052	0,067
0,067	0,055	0,054	0,055	0,054	0,065
0,065	0,052	0,053	0,057	0,056	0,061
0,061	0,057	0,056	0,058	0,053	0,065
0,056	0,058	0,055	0,052	0,052	0,056
0,060	0,052	0,052	0,054	0,052	0,060
0,058	0,054	0,056	0,053	0,052	0,058
0,062	0,053	0,052	0,058	0,057	0,062
0,067	0,058	0,054	0,052	0,058	0,067
0,065	0,057	0,052	0,054	0,052	0,065
0,061	0,052	0,055	0,053	0,054	0,067
0,056	0,058	0,057	0,052	0,053	0,061
0,062	0,052	0,058	0,056	0,052	0,056
0,067	0,054	0,052	0,056	0,056	0,060
0,065	0,053	0,054	0,052	0,052	0,058
0,061	0,055	0,053	0,054	0,054	0,062
0,056	0,052	0,053	0,052	0,052	0,067
0,060	0,056	0,056	0,052	0,052	0,065
0,058	0,055	0,055	0,054	0,049	0,061

Tabela X – Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos poços **Controlo** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Controlo das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
1,748	1,004	0,916	0,933	0,621	0,211
1,881	0,904	0,925	1,097	0,621	0,227
1,961	1,121	0,916	1,071	0,634	0,254
1,920	0,988	0,925	0,987	0,704	0,248
1,829	0,928	0,966	1,288	0,675	0,198
1,914	0,958	0,930	0,936	0,679	0,203
2,217	1,061	1,466	0,966	0,699	0,213
2,188	1,453	1,804	0,953	0,770	0,214
2,179	1,384	1,780	0,972	0,698	0,209
2,235	1,337	1,879	0,966	0,740	0,252
1,999	1,478	1,800	0,971	0,755	0,204
2,252	1,185	1,570	0,961	0,715	0,206

Tabela XI – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **HCT116**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular HCT116 para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,062	0,052	0,045	0,522	0,513	0,550	1,766	1,791
0,057	0,048	0,046	0,547	0,557	0,690	1,798	1,951
0,062	0,047	0,048	0,484	0,475	0,604	1,729	2,349
0,061	0,048	0,047	0,462	0,507	0,582	1,487	2,383
0,064	0,050	0,046	0,488	0,555	0,651	1,701	1,977
0,069	0,057	0,049	0,506	0,656	0,672	1,966	2,147

Tabela XII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **HT1080**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular HT1080 para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,058	0,057	0,055	0,052	0,225	0,218	0,318	0,936
0,047	0,048	0,059	0,053	0,198	0,190	0,368	0,921
0,050	0,057	0,059	0,058	0,259	0,275	0,378	0,951
0,047	0,057	0,064	0,057	0,235	0,192	0,350	1,126
0,047	0,047	0,051	0,056	0,265	0,217	0,359	1,345
0,051	0,058	0,056	0,053	0,174	0,212	0,383	1,081

Tabela XIII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **TE671**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular TE671 para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,055	0,053	0,049	0,488	0,875	0,822	1,447	1,174
0,049	0,066	0,046	0,481	0,859	0,867	1,037	1,504
0,047	0,052	0,093	0,611	0,939	0,871	1,402	1,530
0,051	0,052	0,066	0,614	0,922	0,842	1,340	1,232
0,048	0,049	0,048	0,562	0,880	0,923	1,200	1,769
0,052	0,055	0,068	0,523	0,776	0,798	1,227	1,636

Tabela XIV – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **Hela**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular Hela para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,094	0,091	0,060	0,221	0,183	0,253	0,913	0,964
0,095	0,089	0,061	0,190	0,183	0,233	0,965	0,977
0,096	0,099	0,080	0,256	0,173	0,224	0,955	1,018
0,092	0,104	0,084	0,180	0,175	0,265	0,998	1,036
0,091	0,094	0,080	0,209	0,174	0,214	0,949	1,064
0,097	0,090	0,066	0,183	0,174	0,246	0,970	0,998

Tabela XV – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular não tumoral **Vero**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular Vero para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,052	0,049	0,052	0,224	0,307	0,560	0,591	0,603
0,055	0,048	0,045	0,229	0,285	0,590	0,583	0,640
0,054	0,049	0,049	0,227	0,316	0,599	0,596	0,603
0,057	0,049	0,051	0,207	0,316	0,590	0,597	0,580
0,066	0,049	0,052	0,294	0,276	0,557	0,595	0,605
0,052	0,046	0,050	0,243	0,313	0,598	0,591	0,646

Tabela XVI – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular não tumoral **FHs74 Int**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações de paclitaxel, nomeadamente 1×10^{-3} M; 1×10^{-4} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-6} M; 1×10^{-7} M; 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M; 1×10^{-10} M.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular FHs74 Int para as diferentes concentrações de paclitaxel							
1×10^{-3} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-7} M	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M
0,043	0,045	0,048	0,120	0,126	0,134	0,160	0,197
0,045	0,043	0,047	0,121	0,131	0,134	0,161	0,232
0,046	0,045	0,048	0,121	0,126	0,135	0,161	0,198
0,047	0,050	0,049	0,129	0,126	0,129	0,163	0,203
0,044	0,044	0,046	0,119	0,129	0,130	0,163	0,198
0,047	0,045	0,049	0,116	0,125	0,139	0,162	0,193

• **Avaliação da citotoxicidade do Tampão Tris-EDTA (TE) pelo ensaio Sulforrodamina B**

Tabela XVII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos poços **Branco** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Branco das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,046	0,050	0,050	0,039	0,034	0,034
0,041	0,039	0,049	0,029	0,03	0,029
0,043	0,041	0,051	0,03	0,035	0,035
0,042	0,037	0,047	0,031	0,028	0,029
0,043	0,055	0,043	0,033	0,036	0,069
0,046	0,044	0,052	0,035	0,027	0,028
0,052	0,037	0,05	0,036	0,027	0,026
0,052	0,040	0,081	0,029	0,038	0,025
0,042	0,046	0,045	0,041	0,037	0,035
0,039	0,040	0,043	0,035	0,037	0,037
0,039	0,039	0,039	0,033	0,04	0,035
0,039	0,040	0,04	0,038	0,04	0,038
0,041	0,043	0,041	0,037	0,041	0,034
0,042	0,040	0,04	0,053	0,042	0,036
0,043	0,040	0,042	0,045	0,037	0,035
0,045	0,046	0,041	0,042	0,039	0,038
0,044	0,042	0,042	0,042	0,059	0,035
0,039	0,042	0,041	0,042	0,045	0,036
0,041	0,041	0,038	0,047	0,046	0,040
0,044	0,040	0,042	0,045	0,044	0,041
0,051	0,041	0,043	0,042	0,047	0,046
0,04	0,039	0,04	0,039	0,048	0,041
0,043	0,039	0,042	0,04	0,046	0,038
0,043	0,041	0,048	0,04	0,046	0,038
0,045	0,044	0,042	0,04	0,047	0,039
0,043	0,043	0,044	0,041	0,043	0,043
0,039	0,041	0,047	0,044	0,043	0,037
0,039	0,039	0,042	0,042	0,044	0,040
0,042	0,041	0,045	0,047	0,041	0,035
0,041	0,044	0,042	0,05	0,043	0,036
0,04	0,044	0,043	0,044	0,042	0,038
0,04	0,041	0,047	0,043	0,041	0,036
0,046	0,039	0,046	0,042	0,04	0,036
0,042	0,040	0,042	0,042	0,044	0,040

Tabela XVIII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos poços **Controlo** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Controlo das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,042	0,119	0,056	0,042	0,054	0,077
0,040	0,132	0,044	0,043	0,055	0,041
0,042	0,127	0,053	0,044	0,055	0,035
0,043	0,128	0,055	0,049	0,051	0,059
0,043	0,137	0,053	0,042	0,054	0,035
0,040	0,138	0,052	0,043	0,076	0,036
1,190	0,099	0,442	0,481	0,368	0,037
1,347	0,119	0,482	0,591	0,357	0,039
1,207	0,110	0,468	0,525	0,379	0,037
1,347	0,112	0,449	0,489	0,353	0,037
1,372	0,106	0,427	0,524	0,352	0,037
1,344	0,117	0,472	0,483	0,347	0,037

Tabela XIX – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **HCT116**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do tampão TE, nomeadamente 36 mM de Tris e 0.7 mM de EDTA; 36×10^{-1} mM de Tris e 0.7×10^{-1} mM de EDTA; 36×10^{-2} mM de Tris e 0.7×10^{-2} mM de EDTA; 36×10^{-3} mM de Tris e 0.7×10^{-3} mM de EDTA; 36×10^{-4} mM de Tris e 0.7×10^{-4} mM de EDTA; 36×10^{-5} mM de Tris e 0.7×10^{-5} mM de EDTA; 36×10^{-6} mM de Tris e 0.7×10^{-6} mM de EDTA.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular HCT116 para as diferentes concentrações de tampão TE						
TE 36 mM Tris 0.7 mM EDTA	TE x 10 ⁻¹ mM	TE x 10 ⁻² mM	TE x 10 ⁻³ mM	TE x 10 ⁻⁴ mM	TE x 10 ⁻⁵ mM	TE x 10 ⁻⁶ mM
1,221	0,810	1,327	1,446	1,288	1,191	1,264
1,319	0,791	1,376	1,320	1,430	1,299	1,458
1,194	0,928	1,344	1,265	1,311	1,404	1,384
1,165	1,324	1,299	1,267	1,270	1,154	1,294
1,180	1,438	1,284	1,241	1,359	1,290	1,306
1,179	1,347	1,358	1,323	1,348	1,271	1,266

Tabela XX – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **HT1080**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do tampão TE, nomeadamente 36 mM de Tris e 0.7 mM de EDTA; 36×10^{-1} mM de Tris e 0.7×10^{-1} mM de EDTA; 36×10^{-2} mM de Tris e 0.7×10^{-2} mM de EDTA; 36×10^{-3} mM de Tris e 0.7×10^{-3} mM de EDTA; 36×10^{-4} mM de Tris e 0.7×10^{-4} mM de EDTA; 36×10^{-5} mM de Tris e 0.7×10^{-5} mM de EDTA; 36×10^{-6} mM de Tris e 0.7×10^{-6} mM de EDTA.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular HT1080 para as diferentes concentrações de tampão TE						
TE 36 mM Tris 0.7 mM EDTA	TE x 10⁻¹ mM	TE x 10⁻² mM	TE x 10⁻³ mM	TE x 10⁻⁴ mM	TE x 10⁻⁵ mM	TE x 10⁻⁶ mM
0,109	0,074	0,106	0,116	0,127	0,120	0,121
0,111	0,065	0,122	0,123	0,111	0,127	0,107
0,105	0,072	0,123	0,112	0,117	0,117	0,116
0,114	0,127	0,131	0,132	0,120	0,132	0,125
0,103	0,122	0,114	0,115	0,112	0,131	0,125
0,099	0,134	0,134	0,125	0,130	0,133	0,133

Tabela XXI – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **TE671**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do tampão TE, nomeadamente 36 mM de Tris e 0.7 mM de EDTA; 36×10^{-1} mM de Tris e 0.7×10^{-1} mM de EDTA; 36×10^{-2} mM de Tris e 0.7×10^{-2} mM de EDTA; 36×10^{-3} mM de Tris e 0.7×10^{-3} mM de EDTA; 36×10^{-4} mM de Tris e 0.7×10^{-4} mM de EDTA; 36×10^{-5} mM de Tris e 0.7×10^{-5} mM de EDTA; 36×10^{-6} mM de Tris e 0.7×10^{-6} mM de EDTA.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular TE671 para as diferentes concentrações de tampão TE						
TE 36 mM Tris 0.7 mM EDTA	TE x 10⁻¹ mM	TE x 10⁻² mM	TE x 10⁻³ mM	TE x 10⁻⁴ mM	TE x 10⁻⁵ mM	TE x 10⁻⁶ mM
0,438	0,290	0,490	0,444	0,484	0,495	0,499
0,456	0,300	0,493	0,482	0,471	0,492	0,495
0,487	0,316	0,508	0,483	0,525	0,515	0,488
0,485	0,443	0,484	0,481	0,498	0,489	0,508
0,454	0,447	0,463	0,464	0,487	0,465	0,524
0,449	0,440	0,464	0,466	0,469	0,453	0,463

Tabela XXII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **Hela**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do tampão TE, nomeadamente 36 mM de Tris e 0.7 mM de EDTA; 36×10^{-1} mM de Tris e 0.7×10^{-1} mM de EDTA; 36×10^{-2} mM de Tris e 0.7×10^{-2} mM de EDTA; 36×10^{-3} mM de Tris e 0.7×10^{-3} mM de EDTA; 36×10^{-4} mM de Tris e 0.7×10^{-4} mM de EDTA; 36×10^{-5} mM de Tris e 0.7×10^{-5} mM de EDTA; 36×10^{-6} mM de Tris e 0.7×10^{-6} mM de EDTA.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular Hela para as diferentes concentrações de tampão TE						
TE 36 mM Tris 0.7 mM EDTA	TE x 10^{-1} mM	TE x 10^{-2} mM	TE x 10^{-3} mM	TE x 10^{-4} mM	TE x 10^{-5} mM	TE x 10^{-6} mM
0,570	0,527	0,568	0,608	0,632	0,677	0,595
0,596	0,514	0,610	0,603	0,608	0,58	0,544
0,577	0,519	0,606	0,619	0,616	0,721	0,641
0,586	0,664	0,683	0,673	0,655	0,700	0,638
0,568	0,657	0,657	0,679	0,647	0,709	0,614
0,567	0,648	0,653	0,664	0,665	0,798	0,648

Tabela XXIII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular não tumoral **Vero**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do tampão TE, nomeadamente 36 mM de Tris e 0.7 mM de EDTA; 36×10^{-1} mM de Tris e 0.7×10^{-1} mM de EDTA; 36×10^{-2} mM de Tris e 0.7×10^{-2} mM de EDTA; 36×10^{-3} mM de Tris e 0.7×10^{-3} mM de EDTA; 36×10^{-4} mM de Tris e 0.7×10^{-4} mM de EDTA; 36×10^{-5} mM de Tris e 0.7×10^{-5} mM de EDTA; 36×10^{-6} mM de Tris e 0.7×10^{-6} mM de EDTA.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular Vero para as diferentes concentrações de tampão TE						
TE 36 mM Tris 0.7 mM EDTA	TE x 10^{-1} mM	TE x 10^{-2} mM	TE x 10^{-3} mM	TE x 10^{-4} mM	TE x 10^{-5} mM	TE x 10^{-6} mM
0,361	0,237	0,370	0,388	0,419	0,444	0,373
0,341	0,241	0,435	0,361	0,398	0,381	0,36
0,327	0,225	0,410	0,400	0,411	0,387	0,344
0,320	0,555	0,456	0,430	0,489	0,455	0,498
0,353	0,488	0,463	0,557	0,499	0,474	0,525
0,340	0,500	0,487	0,484	0,515	0,463	0,497

Tabela XXIV – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular não tumoral **FHs74 Int**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do tampão TE, nomeadamente 36 mM de Tris e 0.7 mM de EDTA; 36×10^{-1} mM de Tris e 0.7×10^{-1} mM de EDTA; 36×10^{-2} mM de Tris e 0.7×10^{-2} mM de EDTA; 36×10^{-3} mM de Tris e 0.7×10^{-3} mM de EDTA; 36×10^{-4} mM de Tris e 0.7×10^{-4} mM de EDTA; 36×10^{-5} mM de Tris e 0.7×10^{-5} mM de EDTA; 36×10^{-6} mM de Tris e 0.7×10^{-6} mM de EDTA.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular FHs74 Int para as diferentes concentrações de tampão TE						
TE 36 mM Tris 0.7 mM EDTA	TE x 10⁻¹ mM	TE x 10⁻² mM	TE x 10⁻³ mM	TE x 10⁻⁴ mM	TE x 10⁻⁵ mM	TE x 10⁻⁶ mM
0,037	0,040	0,039	0,038	0,040	0,038	0,039
0,039	0,037	0,036	0,040	0,039	0,040	0,037
0,039	0,037	0,036	0,036	0,036	0,04	0,041
0,037	0,039	0,039	0,039	0,037	0,036	0,039
0,039	0,037	0,038	0,038	0,040	0,039	0,039
0,041	0,038	0,038	0,047	0,038	0,039	0,041

• **Avaliação da citotoxicidade do extracto de ciprosona pelo ensaio Sulforrodamina B**

Tabela XXV – Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos poços **Branco** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Branco das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,042	0,044	0,040	0,055	0,042	0,040
0,041	0,040	0,038	0,054	0,037	0,037
0,04	0,043	0,037	0,055	0,038	0,036
0,049	0,046	0,038	0,051	0,037	0,037
0,054	0,083	0,038	0,050	0,037	0,041
0,046	0,042	0,051	0,052	0,037	0,036
0,054	0,052	0,054	0,053	0,040	0,041
0,139	0,048	0,043	0,064	0,039	0,038
0,048	0,065	0,042	0,042	0,044	0,040
0,050	0,059	0,051	0,044	0,041	0,037
0,054	0,042	0,042	0,042	0,04	0,039
0,049	0,052	0,041	0,045	0,038	0,038
0,046	0,065	0,044	0,045	0,040	0,039
0,063	0,056	0,038	0,074	0,040	0,040
0,055	0,058	0,062	0,061	0,044	0,039
0,071	0,046	0,05	0,048	0,044	0,039
0,038	0,038	0,039	0,039	0,041	0,039
0,487	0,044	0,040	0,788	0,039	0,038
0,477	0,272	1,290	0,716	0,042	0,039
0,479	0,302	1,334	0,560	0,040	0,038
0,494	0,287	1,343	0,651	0,049	0,038
0,485	0,370	1,485	0,703	0,043	0,037
0,453	0,272	1,131	0,651	0,043	0,038
0,452	0,33	1,484	0,656	0,039	0,041
0,432	0,282	1,134	0,697	0,040	0,036
0,434	0,368	1,662	0,658	0,040	0,042
0,042	0,253	1,281	0,037	0,039	0,043
0,498	0,227	1,713	0,831	0,039	0,039
0,425	0,291	1,753	0,725	0,036	0,037
0,452	0,255	1,731	0,693	0,037	0,038
0,492	0,249	1,956	0,721	0,039	0,051
0,464	0,229	2,043	0,777	0,037	0,039
0,461	0,320	1,347	0,751	0,045	0,039
0,490	0,269	1,522	0,796	0,041	0,041
0,452	0,235	1,903	0,854	0,037	0,039
0,432	0,346	1,685	0,871	0,037	0,040

Tabela XXVI – Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos poços **Controlo** para as linhas celulares tumorais HCT116, HT1080; TE671; Hela e para as linhas celulares não tumorais Vero e FHs74 Int.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Controlo das linhas celulares estudadas					
HCT116	HT1080	TE671	Hela	Vero	FHs74 Int
0,042	0,039	0,042	0,044	0,167	0,107
0,043	0,040	0,038	0,042	0,183	0,136
0,049	0,045	0,037	0,039	0,174	0,126
0,044	0,042	0,042	0,039	0,197	0,106
0,042	0,04	0,038	0,038	0,189	0,108
0,040	0,042	0,037	0,039	0,172	0,112
0,557	0,268	1,506	0,044	0,209	0,110
0,497	0,293	1,873	0,042	0,222	0,110
0,498	0,267	1,992	0,039	0,193	0,113
0,539	0,315	1,982	0,039	0,226	0,112
0,580	0,271	1,883	0,038	0,202	0,113
0,546	0,234	2,106	0,039	0,232	0,115

Tabela XXVII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **HCT116**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do extracto de ciprosona, nomeadamente 1000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL; 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular HCT116 para as diferentes concentrações do extracto de ciprosona						
1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1µg/mL	0,01 µg/mL	0,001µg/mL
0,546	0,042	0,264	0,512	0,530	0,500	0,512
0,53	0,039	0,275	0,537	0,479	0,511	0,491
0,553	0,041	0,274	0,550	0,558	0,518	0,560
0,549	0,514	0,494	0,493	0,530	0,467	0,525
0,544	0,482	0,556	0,492	0,496	0,484	0,522
0,517	0,449	0,459	0,485	0,493	0,423	0,498

Tabela XXVIII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **HT1080**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do extracto de ciprosona, nomeadamente 1000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL; 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular HT1080 para as diferentes concentrações do extracto de ciprosona						
1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1µg/mL	0,01 µg/mL	0,001µg/mL
0,309	0,044	0,095	0,284	0,260	0,305	0,266
0,285	0,051	0,099	0,279	0,269	0,286	0,26
0,272	0,047	0,101	0,296	0,262	0,273	0,263
0,294	0,297	0,289	0,327	0,269	0,272	0,266
0,280	0,331	0,300	0,335	0,245	0,254	0,258
0,301	0,308	0,337	0,325	0,237	0,293	0,230

Tabela XXIX – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **TE671**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do extracto de ciproquina, nomeadamente 1000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL; 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular TE671 para as diferentes concentrações do extracto de ciproquina						
1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1µg/mL	0,01 µg/mL	0,001µg/mL
1,423	0,039	0,350	1,392	1,513	1,478	1,657
1,319	0,043	0,362	1,400	1,688	1,644	1,339
1,494	0,043	0,394	1,413	1,374	1,328	1,431
1,480	1,289	1,275	1,276	1,244	1,207	1,203
1,534	1,355	1,338	1,129	1,142	1,223	1,211
1,461	1,289	1,225	1,326	1,243	1,303	1,292

Tabela XXX – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular tumoral **Hela**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do extracto de ciproquina, nomeadamente 1000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL; 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular Hela para as diferentes concentrações do extracto de ciproquina						
1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1µg/mL	0,01 µg/mL	0,001µg/mL
0,880	0,726	0,429	0,617	0,718	0,769	0,743
0,843	0,835	0,424	0,701	0,767	0,838	0,775
0,864	0,829	0,413	0,710	0,822	0,846	0,822
0,842	0,822	0,725	0,764	0,831	0,804	0,754
0,885	0,881	0,716	0,783	0,819	0,798	0,803
0,866	0,847	0,730	0,756	0,786	0,804	0,862

Tabela XXXI – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular não tumoral **Vero**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do extracto de ciproquina, nomeadamente 1000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL; 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL e 0,001 µg/mL.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular Vero para as diferentes concentrações do extracto de ciproquina						
1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1µg/mL	0,01 µg/mL	0,001µg/mL
0,209	0,044	0,194	0,197	0,196	0,177	0,199
0,222	0,042	0,222	0,231	0,189	0,196	0,199
0,193	0,042	0,22	0,225	0,214	0,188	0,184
0,226	0,262	0,231	0,211	0,228	0,248	0,207
0,202	0,217	0,210	0,214	0,218	0,227	0,189
0,232	0,214	0,226	0,236	0,206	0,217	0,192

Tabela XXXII – Valores de absorvância obtidos a 515 nm para a linha celular não tumoral **FHs74 Int**, nos poços **Teste**, onde foram aplicadas diferentes concentrações do extracto de ciproquina, nomeadamente 1000 µg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL; 1 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,01 µg/mL e 0,001µg/mL.

Valores de absorvância obtidos a 515 nm nos Poços Teste da linha celular FHs74 Int para as diferentes concentrações do extracto de ciproquina						
1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1µg/mL	0,01 µg/mL	0,001µg/mL
0,107	0,051	0,077	0,101	0,114	0,113	0,103
0,136	0,049	0,083	0,097	0,131	0,128	0,112
0,126	0,047	0,089	0,103	0,14	0,113	0,117
0,106	0,122	0,113	0,130	0,125	0,129	0,107
0,108	0,119	0,116	0,122	0,130	0,121	0,115
0,112	0,121	0,102	0,120	0,121	0,113	0,107