



Mestrado em Bioquímica

Actividade anti-tumoral de extractos de *Cynara cardunculus* na
via molecular do PI3K/AKT/mTOR

Ângela da Conceição Relvas Guerra

Orientador: Doutora Maria de Fátima Pereira Duarte

Co-orientador: Prof. Doutora Maria do Rosário Caeiro Martins

Évora

2010

Actividade anti-tumoral de extractos de *Cynara cardunculus* na
via molecular do PI3K/AKT/mTOR

Ângela da Conceição Relvas Guerra

Orientador: Doutora Maria de Fátima Pereira Duarte

Co-orientador: Prof. Doutora Maria do Rosário Caeiro Martins

Agradecimentos

A todas as pessoas que contribuíram para a realização do presente trabalho, desejo expressar o meu mais sincero agradecimento.

Devo de agradecer ao Departamento de Química da Universidade de Évora, onde o Mestrado de Bioquímica é leccionado, pela oportunidade de me deixar desenvolver os trabalhos conducentes a esta tese num laboratório fora da Universidade, o meu muito obrigado.

À Doutora Fátima Duarte pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio, dedicação, tempo e incentivo durante todas as fases deste projecto. Obrigado pelo acolhimento no grupo de trabalho do Laboratório dos Compostos Bioactivos do CEBAL, bem como todos os restantes investigadores, sobretudo pela amizade, muito obrigado por todo o apoio e incentivo. À Olinda Guerreiro e à Patrícia Ramos um obrigado muito especial por todas as “ajudinhas”, sem vocês teria sido muito mais difícil.

À Professora Doutora Maria do Rosário Martins, na qualidade de Co-Orientadora, agradeço toda a disponibilidade, tempo, apoio e simpatia durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Teresa Caldeira o meu obrigado pela disponibilidade e apoio demonstrada ao longo do trabalho.

À minha Paula por ser sempre a minha inspiração.

Ao Filipe muito obrigado por todo o apoio e compreensão, sobretudo nesta recta final. “Sabes uma coisa?”

Aos meus pais, obrigado por tudo...

Índice

Índice de figuras	7
Índice de tabelas	10
Abreviaturas	12
Resumo.....	14
Abstract	16
1. Fitoterapia	19
1.1. Compostos fenólicos	20
1.1.1. Actividade biológica de compostos polifenólicos	22
1.2. <i>Cynara cardunculus</i>	23
1.2.1. Caracterização do potencial de extractos de <i>Cynara Cardunculus</i>	24
2. Oncobiologia.....	26
2.1. Proliferação tumoral.....	28
2.2. Carcinoma Hepatoceular.....	29
2.2.1. Potencial dos compostos fitoquímicos na prevenção e/ou tratamento do carcinoma hepatocelular	30
2.3. Cancro da Mama	31
2.3.1. Potencial dos compostos fitoquímicos na prevenção e/ou tratamento do cancro da mama	32
3. Via molecular do PI3K/AKT/mTOR	33
3.1. PI3K	34
3.1.1. Descrição das várias classes do PI3K.....	34
3.2. AKT.....	36
3.2.1. Papel da AKT na regulação de diferentes mecanismos celulares	37
3.3. mTOR.....	38
3.3.1. Papel do mTOR na regulação de diferentes mecanismos celulares	39
3.4. Envolvência da via do PI3K/AKT/mTOR na regulação da resposta tumoral.....	40
3.4.1. Inibidores da via do PI3K/AKT/mTOR com potencial aplicação oncológica	41
3.5. Efeito de compostos fitoquímicos na regulação da via do Pi3K/AKT/mTOR.....	43
B. Enquadramento da problemática e objectivos	46
1. Problemática.....	47
2. Objectivos	48
C. Material e Métodos.....	50
1. Material	51

1.1.	Extractos de caule cultivado fresco (CCF) e folha cultivada fresca (FCF) de <i>Cynara cardunculus</i> variedade cultivada.....	51
1.2.	Cultura de células animais: modelo <i>in vitro</i> para o carcinoma hepatocelular (HepG2) e para o cancro da mama fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231)	51
2.	Métodos.....	52
2.1.	Efeito anti-proliferativo de extractos de Cc (CCF e FCF) em células tumorais.....	52
2.2.1.	Determinação do IC ₅₀ para extractos de CCF e FCF de Cc em células HepG2 e MDA-MB-231.....	52
2.2.	Expressão génica das isoformas do PI3K em células tumorais incubadas com extracto da FCF de Cc.....	53
2.2.1.	Extracção de ARN.....	53
2.2.2.	Síntese de cADN	54
2.2.3.	PCR para as isoformas do p110 (α , β , γ) da classe I do PI3K.....	54
2.3.	Análise da expressão proteica de AKT em células de cancro da mama tratadas com extracto de FCF de Cc.....	56
2.3.1.	Preparação dos lisados proteicos.....	56
2.3.2.	Quantificação total de proteínas	56
2.3.3.	<i>Western-blott</i> para a proteína AKT	56
2.4.	Análise estatística.....	57
D.	Resultados e Discussão	58
1.	Efeito anti-proliferativo de extractos de Cc (CCF e FCF) em células tumorais.....	60
2.	Efeito do extracto de FCF de Cc na expressão génica das isoformas do PI3K em células tumorais.....	65
3.	Análise da expressão proteica de AKT em células de cancro da mama tratadas com extracto de FCF de Cc.....	69
E.	Conclusões e perspectivas futuras	72
F.	Referências Bibliográficas	76
G.	Anexos.....	86
Anexo I –	Protocolos.....	87
i.	Descongelamento das células.....	87
ii.	Subcultura de células.....	87
iii.	Determinação da viabilidade celular por azul de tripano	88
iv.	Preparação de <i>pellets</i> celulares para a extracção de ARN.....	88
v.	Extracção de ARN.....	88
vi.	Avaliação da integridade do ARN por electroforese em gel de agarose	89
vii.	Determinação da concentração de ARN	89

viii.	Síntese de cADN	90
ix.	Condições das reacções de PCR para os genes em estudo	91
x.	Obtenção de lisados proteicos para <i>western blot</i>	92
xi.	Determinação da concentração de proteína total nos lisados proteicos.....	92
a)	Curva padrão	92
xii.	<i>Western blot</i>	93
a)	SDS-PAGE.....	93
b)	Transferência (tipo <i>tank-blotting</i> - Hoefer [®])	94
c)	Incubação com anticorpos	94
d)	Detecção.....	95

Índice de figuras

Figura 1: Classificação geral de fitoquímicos, com representação esquemática das cinco principais classes: carotenóides, compostos fenólicos, alcalóides, compostos contendo azoto e compostos organosulfurados. Principal destaque para a divisão da classe dos compostos fenólicos, nas várias subclasses de ácidos fenólicos e flavonóides.....	21
Figura 2: Estrutura química de um fenol simples, com um grupo hidroxilo ligado a um anel aromático, de fórmula geral C_6H_5OH	22
Figura 3: Estrutura química de alguns polifenóis comuns na dieta, com a presença em todos os casos de pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxilo ligado.....	22
Figura 4: Imagem do aspecto físico de duas variedades diferentes da planta <i>Cynara cardunculus</i> . A - <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>altilis</i> ; B – <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>sylvestris</i>	24
Figura 5: Quantificação dos compostos fenólicos totais e flavonóides em extractos metanólicos de <i>Cynara cardunculus</i> variedade cultivada e selvagem. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada pelo método colorimétrico do Folin Ciocalteu, sendo as respectivas concentrações expressas em equivalente de ácido gálico (mg)/g peso seco. Os compostos flavonóides foram quantificados, também, por uma metodologia colorimétrica, baseada no cloreto de alumínio, e os resultados expressos em equivalente de quercetina (mg)/g peso seco.....	26
Figura 6: Taxa mundial de, mortalidade por HCC. As taxas reportam-se a 100.000 indivíduos de ambos os sexos, abrangendo todas as faixas etárias.....	30
Figura 7: Taxa mundial de mortalidade por cancro da mama. As taxas reportam-se a 100.000 indivíduos do sexo feminino e a todas as faixas etárias.....	32
Figura 8: Representação esquemática das diferentes classes da cinase 3-fosfatidilinositol: classe I, II e III. Identificação das subclasses IA e IB com identificação das respectivas subunidades catalíticas p110 α , β , e δ , e p110 γ respectivamente.....	35
Figura 9: Mecanismo de activação da classe IA do PI3K pelos receptores RTK. Referência para as subunidades catalíticas p110 α , β , e δ em associação com a subunidades reguladoras p85.....	36
Figura 10: Mecanismo de activação da classe IB do PI3K pelos receptores de membrana GPCR. Referência para a subunidade catalítica p110 γ	37
Figura 11: Representação esquemática de algumas das funções celulares da via do AKT. Destaque para a envolvimento da via na resposta à proliferação, ao metabolismo, sobrevivência e resposta angiogénica face a certos substratos.....	39

- Figura 12: Representação esquemática da via molecular do PI3K/AKT/mTOR com destaque para as subunidades catalíticas e reguladoras do PI3K (p110 e p85), os locais de fosforilação da proteína AKT (pAKT Thr308 e Ser473), bem como os complexos proteicos mTORC1 e mTORC2 em contexto de activação dos receptores de membrana GPCRs e RTKs.....41
- Figura 13: Representação esquemática da estrutura química do inibidor da via do PI3K - LY294002.....43
- Figura 14: Representação esquemática da estrutura do inibidor, da via do PI3K - Wortmanina43
- Figura 15: Representação gráfica do efeito da concentração de extracto de Folha Cultivada Fresca de *Cynara cardunculus* no crescimento celular de células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2). As células foram incubadas durante 48h, com concentrações crescentes de extracto (0,46 – 4,6 µg/mL de compostos fenólicos totais). Como controlo foram utilizadas células HepG2 sem tratamento e células HepG2 com solvente (PBS) utilizado na diluição dos extractos. Os valores vêm afectados dos erros padrões médios, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas. Grupos sem letras em comum são significativamente diferentes, $P < 0,05$62
- Figura 16: Representação gráfica da determinação do valor de IC₅₀ relativos à viabilidade celular, em termos de crescimento, das HepG2 quando incubadas, durante 48h, com concentrações crescentes de extracto de FCF de Cc. A análise dos dados foi efectuada utilizando o programa Origin 6.1. Os valores vêm afectados dos erros padrões médios, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas.....62
- Figura 17: Representação gráfica do efeito da concentração de extracto de Caule Cultivado Fresco de *Cynara cardunculus* no crescimento celular de células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2). As células foram incubadas durante 48h, com concentrações crescentes de extracto (0,1 – 28,8 µg/mL de compostos fenólicos totais). Como controlo foram utilizadas células HepG2 sem tratamento e células HepG2 com solvente (PBS) utilizado na diluição dos extractos. Os valores vêm afectados dos erros padrões médios, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas. Grupos sem letras em comum são significativamente diferentes, $P < 0,05$64
- Figura 18: Representação gráfica do efeito da concentração de extracto de Folha Cultivada Fresca de *Cynara cardunculus* no crescimento celular de células MDA-MB-231. As células foram incubadas durante 48h, com concentrações crescentes de extracto (0,1 – 2,5 µg/mL de compostos fenólicos totais). Como controlo foram utilizadas células MDA-MB-231 sem tratamento e células MDA-MB-231 com solvente (PBS) utilizado na diluição dos extractos. Os valores vêm afectados dos erros padrões médios, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas. Grupos sem letras em comum são significativamente diferentes, $P < 0,05$65

Figura 19: Representação gráfica da determinação dos valores de IC₅₀ relativos à viabilidade celular, em termos de crescimento, das células MDA-MB-231 incubadas, durante 48h, com diferentes concentrações de extracto de FCF de Cc. A análise estatística dos dados foi efectuada utilizando o programa Origin 6.1. Os valores vêm afectados dos erros padrões médios, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas...66

Figura 20: Visualização dos produtos de PCR, resultantes da análise, por RT-PCR dos níveis de expressão das isoformas da subunidade p110 classe I do PI3K, em células humanas de carcinoma hepatocelular, incubadas durante 48h na presença de concentrações correspondentes ao IC₅₀ para o extracto de FCF. Como gene de referência foi utilizado a β-actina.- Legenda: 1- Marcador de peso molecular; 2- Controlo – células HepG2 sem adição do extracto; 3- Células HepG2 tratadas com 1,74 µg/ml de compostos fenólicos totais do extracto de FCF.....67

Figura 21: Análise densiométrica para determinação das razões de expressão entre as isoformas α, β, γ da subunidade p110 da classe I do PI3K, e o gene de referência β-actina em células HepG2. Análise densiométrica das bandas em gel (n=1) de agarose 1,5% utilizando o programa *QuantityOne* da BioRad.68

Figura 22: Visualização dos produtos de PCR, resultantes da análise, por RT-PCR dos níveis de expressão das isoformas da subunidade p110 classe I do PI3K, em células humanas de cancro da mama, fenótipo triplo negativo, incubadas durante 48h na presença de concentrações correspondentes ao IC₅₀, para o extracto de FCF para estas células. Como controlo interno foi utilizado um inibidor comercial da via do PI3K, o LY294002. Como gene de referência foi utilizado a β-actina.- Legenda:1- Marcador de peso molecular; 2- Controlo – células MDA-MB-231 sem adição de extracto, apenas incubadas com o respectivo meio de cultura; 3- Células MDA-MB-231 tratadas com 0,74 µg/mL compostos fenólicos totais do extracto de FCF; 4 – Células tratadas com o solvente no qual foi dissolvido o inibidor LY294002 (DMSO); 5- Células tratadas com LY294002 (25 µM).....69

Figura 23: Análise densiométrica para a determinação das razões de expressão entre as isoformas α, β, γ da subunidade p110 da classe I do PI3K, e o gene de referência β-actina, em células MDA-MB-231. Análise densiométrica das bandas em gel (n=3) de agarose 1,5% utilizando o programa *QuantityOne* da BioRad. Os valores vêm afectados dos erros padrões médios.....69

Figura 24: Imagem representativa da imunodeteção da proteína AKT1 por *western blot* em células humanas de cancro da mama, fenótipo triplo negativo. As células foram incubadas durante 48h na presença de concentrações correspondentes ao IC₅₀, para o extracto de FCF para estas células. Como controlo interno foi utilizado um inibidor comercial da via do PI3K, o LY294002. Como solvente utilizou-se DMSO, uma vez que foi o solvente em que se dissolveu o inibidor comercial. Como proteína de referência foi utilizada a β-actina.....71

Figura 25: Esquema representativo da montagem da *sandwich* para a transferência.....95

Índice de tabelas

Tabela 1: Sequência de oligonucleótidos para as várias isoformas da subunidade catalítica p110 da Classe I do PI3K.....	56
Tabela 2: Componentes da reacção de eliminação de ADN genómico.....	91
Tabela 3: Componentes da reacção de transcriptase reversa.....	91
Tabela 4: Sequência de oligonucleótidos para os vários genes em estudo e gene de referência, condições específicas da reacção de PCR e o respectivo tamanho do fragmento esperado.....	93

Abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

AKT - cinase de serina/treonina

ARN – ácido ribonucleico

ATP - adenosina trifosfato

cADN – complementar ácido desoxirribonucleico

Cc - *Cynara cardunculus*

CCF – caule cultivado fresco

CHC – carcinoma hepatocelular

CO₂ – dióxido de carbono

DEPC – dietilpirocarbonato

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

MEM – *Minimum Essential Medium Eagle*

FBS – soro bovino fetal (*fetal bovine serum*)

FCF – folha cultivada fresca

GFR – receptores de factores de crescimento

GPCRs - receptores acoplados a proteínas G

H₂O - água

HER2 - factor de crescimento epidérmico humano

HPLC-MS – cromatografia líquida de alta eficiência com leitor de espectrometria de massa

mTOR – proteína alvo da rapamicina (*mammalian target of rapamycin*)

mTORC1 - complexo 1 mTOR

mTORC2 - complexo 2 mTOR

NF-κB – factor nuclear Kappa B

PBS – tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PI3K - cinase 3-fosfatidilinositol

PKB – cinase proteica B

RE - receptor de estrogénio

ROS – espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*)

RPg - receptor de progesterona

RTKs - receptor de cinases de tirosina

UV – ultravioleta

Unidades de medida

% - percentagem

µg – microgramas

µL – microlitro

µM - micromolar

cm² – centímetro quadrado

g – grama

h – horas

kDa - kiloDalton

M – molar

min- minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

nm – nanómetro

°C – graus Celsius

rpm – rotações por minuto

s – segundos

V – volts

Resumo

Actividade anti-tumoral de extractos de *Cynara cardunculus* na via molecular do PI3K/AKT/mTOR

O presente trabalho visou avaliar o potencial anti-proliferativo de extractos de folhas (FCF) e caules (CCF) de *Cynara cardunculus* (Cc). Adicionalmente, pretendeu-se caracterizar molecularmente a actividade de extractos de FCF e CCF na via de sinalização do PI3K/AKT/mTOR, em células HepG2 e de cancro da mama de fenótipo triplo negativo MDA-MB-231. Os resultados mostraram que o extracto de FCF apresentou uma pronunciada actividade anti-proliferativa, com um valor de IC₅₀ de 1,74 e 0,74 µg/mL, respectivamente para as células HepG2, e MDA-MB-231. Na presença do extracto FCF os níveis de expressão das isoformas (α , β , γ) do PI3K, nas células MDA-MB-231 não apresentaram diferenças. Porém, a análise do nível de expressão proteica de AKT revelou uma diminuição significativa de expressão em células MDA-MB-231, quando tratadas com extracto de FCF.

Estes resultados sublinham o potencial papel do extracto de FCF na regulação via do PI3K/AKT/mTOR, importante alvo terapêutico para o tratamento oncológico.

Abstract

Anti-tumoral activity of *Cynara cardunculus* extracts in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

The purpose of this study was to characterize the molecular activity of *Cynara cardunculus* extracts on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, on HepG2 and MDA-MB-231 tumor cell lines. The results show that fresh cultivated leaf (FCL) extract has a pronounced anti-proliferative activity, with an IC₅₀ of 1,74 µg/mL expressed in terms of total phenols presented on HepG2 and 0,74 µg/mL expressed in terms of total phenols presented on MDA-MB-231. On MDA-MB-321 cell line there is no significant difference among the expression level of p110 isoforms (α , β , γ) of the PI3K in presence of FCL extract. On the other hand, the protein expression level of total AKT seems to be sensitive to the presence of FCL extracts, since its protein level significantly decreases on MDA-MB-231 cells incubated with FCL extract. These results underlie the putative role of the FCL Cc extract on the regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway.

A. Introdução

1. Fitoterapia

Ao longo da História da Humanidade, as plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional, para um largo espectro de doenças (Phillipson, 2001; Cragg *et al.*, 2009). A busca de novas formulações mais eficazes no tratamento e prevenção de diferentes patologias humanas, tais como o cancro ou doenças infecciosas como a malária (Conforti *et al.*, 2008; Cravotto *et al.*, 2010; Loures *et al.*, 2010), representa um dos maiores desafios da terapia nutricional. A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 65% da população mundial depende da medicina tradicional, tendo por base o uso de plantas, para o tratamento e/ou prevenção de várias doenças (Cragg *et al.*, 2009).

A terapia nutricional ou fitoterapia, que por definição descreve a eficácia e limitação de fitoquímicos no tratamento de patologias (Capasso, 2003), surgiu como um novo conceito para a melhoria da saúde humana, nomeadamente como uma abordagem complementar no tratamento e prevenção. O termo “fito” da palavra fitoquímico deriva do grego *phyto*, que significa planta. Assim, fitoquímicos são químicos derivados, extractáveis de plantas, sendo definidos como compostos bioactivos, presentes em frutos, folhas, sementes, raízes, caules, etc. (Liu, 2004). Ao longo da última década, o conhecimento do papel destes compostos em patologias específicas tem avançado largamente. Devido à sua segurança, baixa toxicidade, propriedades anti-oxidantes e aceitação geral como suplementos dietéticos, estes compostos têm sido estudados de forma a compreender os seus mecanismos bioquímicos, e respectivos alvos moleculares. Os fitoquímicos têm sido associados à redução do risco para determinadas doenças crónicas como o cancro, doenças cardiovasculares, osteoporose, hipertensão e diabetes tipo 2 (Liu, 2004; Scalbert *et al.*, 2005; Biesalski *et al.*, 2009; Lampe, 2009; Faller *et al.*, 2010). Estes compostos fornecem ainda importantes indicadores no desenvolvimento de novos medicamentos, muitos dos quais passam as diferentes fases de aprovação, sendo posteriormente introduzidos no tratamento, por exemplo, do cancro, da malária, da doença de Alzheimer, da infecção com o vírus HIV ou patologias pulmonares (Conforti *et al.*, 2008).

Estima-se que cerca de 5000 fitoquímicos tenham sido já identificados, mas uma grande percentagem permanece ainda desconhecida (Liu, 2004). O facto destes compostos serem maioritariamente de origem vegetal parece confirmar a evidência

epidemiológica que um consumo alto de vegetais está associado, a uma diminuição de risco para diferentes tipos de tumores (Biesalski *et al.*, 2009).

Os fitoquímicos são classificados de acordo com a sua estrutura molecular, existindo cinco classes principais: carotenóides, compostos fenólicos, alcalóides, compostos contendo azoto e compostos organosulfurados (Figura 1) (Liu, 2004; Lampe 2009). Dentre destes grupos os mais estudados são os carotenóides e os compostos fenólicos.

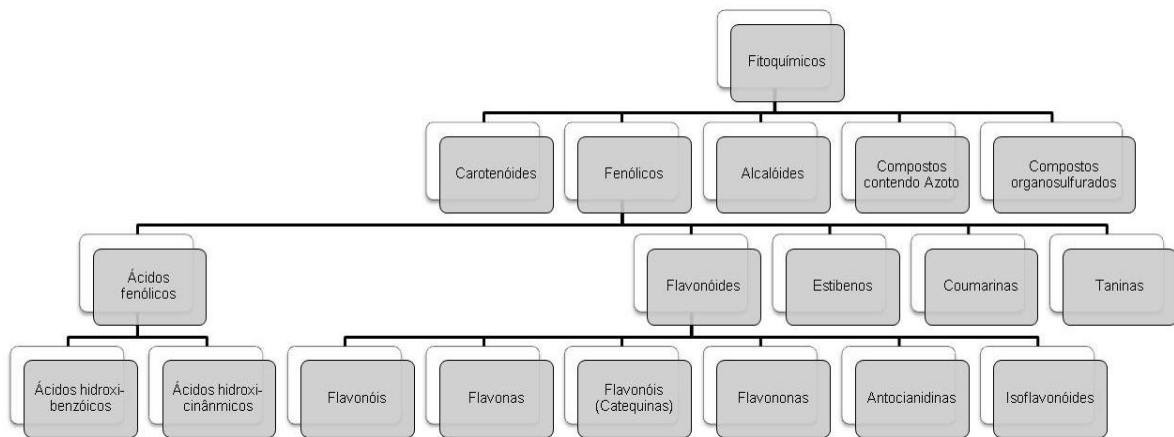


Figura 1: Classificação geral de fitoquímicos, com representação esquemática das cinco principais classes: carotenóides, compostos fenólicos, alcalóides, compostos contendo azoto e compostos organosulfurados. Principal destaque para a divisão da classe dos compostos fenólicos, nas várias subclasses de ácidos fenólicos e flavonóides (adaptado de Liu *et al.*, 2004).

1.1. Compostos fenólicos

Ao longo dos últimos anos, estudos têm enfatizado os benefícios dos compostos fenólicos (Figura 2) para a saúde humana, nomeadamente na estimulação do sistema imunitário, diminuição do risco de doenças degenerativas, inibição da oxidação proteica e promoção de resposta anti-bacteriana, anti-viral, anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, anti-mutagénica e anti-carcinogénica (Miadokova *et al.*, 2008). Muitos destes compostos são classificados como metabolitos secundários das plantas, sendo em geral sintetizados por uma das duas vias biosintéticas: a via do ácido shiquímato ou a via do ácido malónico (ou pelas duas, por exemplo os flavonóides) (Arts *et al.*, 2005). Estima-

se que existam aproximadamente 8000 polifenóis diferentes, que podem ser divididos em 10 classes gerais, de acordo com a sua estrutura química, possuindo como característica comum a presença de pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos – fenol simples (Figura 3) (Arts *et al.*, 2005). As classes mais abundantes em plantas são os ácidos fenólicos, flavonóides, e estilbenos, correspondendo os flavonóides a 60% e os ácidos fenólicos a 30% dos polifenóis provenientes da dieta (Ramos 2007).

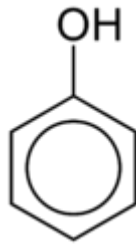


Figura 2: Estrutura química de um fenol simples, com um grupo hidroxilo ligado a um anel aromático, de fórmula geral C_6H_5OH (adaptado de Sun *et al.*, 2007).

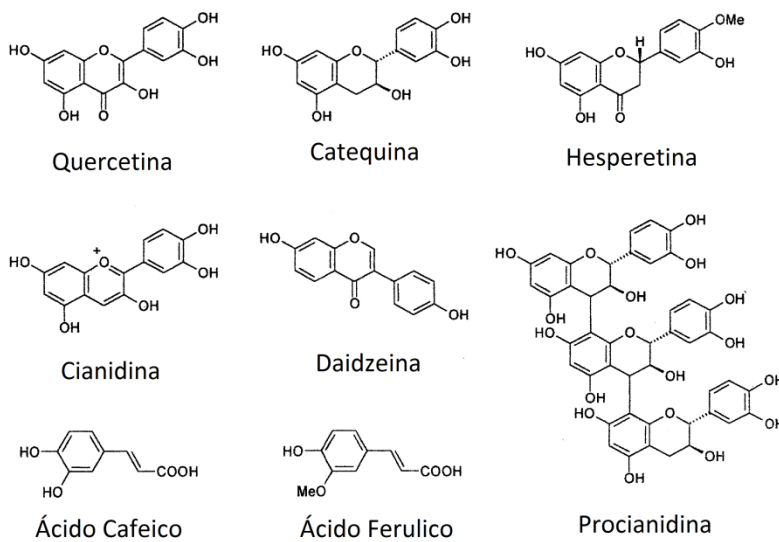


Figura 3: Estrutura química de alguns polifenóis comuns na dieta, com a presença em todos os casos de pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxilo ligado (adaptado de Scalbert *et al.*, 2005).

As principais fontes de polifenóis na dieta são frutas como a maçã, uva, pêra e frutos vermelhos, que contêm cerca de 200-300 mg de polifenóis por 100g de peso fresco. Por outro lado, um copo de vinho tinto, chá ou café contém também cerca de 100 mg de polifenóis. Alimentos como os cereais, chocolate e legumes secos contribuem ainda para o consumo total destes compostos. A ingestão de polifenóis ronda 1g/dia, cerca de 10 vezes mais do que a ingestão de vitamina C e 100 vezes mais que a vitamina E e carotenóides (Scalbert *et al.*, 2005). Os polifenóis ocorrem na natureza predominantemente conjugados com glúcidos (glicósidos), que após a ingestão sofrem clivagem enzimática para a forma livre de aglicona, forma pela qual são absorvidos pelas células epiteliais do intestino (Cooray *et al.*, 2004). Estes compostos são sujeitos à metabolização enzimática, podendo influenciar largamente a sua bioactividade, resultando em produtos metoxilados, glucoronidados e sulfatados (Lampe 2009). Por outro lado, as bactérias presentes no cólon humano metabolizam os polifenóis, dando origem a ácidos fenólicos, como o ácido homovalinílico (Arts *et al.*, 2005).

1.1.1. Actividade biológica de compostos polifenólicos

O estudo do potencial quimiopreventivo de compostos polifenólicos constituintes da dieta tem sido largamente comprovado em modelos consistentes de carcinogénese (Birt *et al.*, 2001). Dados os desafios impostos pelas terapias anti-tumorais, a quimioprevenção utilizando agentes farmacológicos ou naturais, para impedir a progressão ou reverter o processo de tumorigénese em estados iniciais, surge como uma alternativa prática e muito promissora para doentes oncológicos. Até à data, um número substancial de estudos em culturas de células, modelos animais e ensaios clínicos em humanos têm ilustrado o papel preventivo, através da capacidade anti-oxidativa, dos polifenóis provenientes da dieta em diversos tipos de cancro (Scalbert *et al.*, 2005). A acção directa sob as espécies reactivas de oxigénio ou o estímulo dos sistemas de defesa endógenos (Scalbert *et al.*, 2005) conferem uma protecção adicional não só para patologias oncológicas, mas também doenças cardiovasculares.

Para além das propriedades anti-oxidantes os polifenóis demonstram outros efeitos interessantes em animais modelo e/ou em sistemas *in vitro*, nomeadamente,

decréscimo da imobilização de leucócitos, indução de apoptose, actividade fitoestrogénica, inibição de proliferação celular e da angiogénese tumoral, ou seja, diminuição do recrutamento de novos vasos sanguíneos, a partir da vasculatura existente (Carmeliet, 2003; Arts *et al.*, 2005). Assim, de um ponto de vista preventivo, um aporte constante de fitoquímicos, em particular de polifenóis e/ou flavonóides, é essencial em processos de prevenção de danos celulares, bem como no aumento das respostas imunológicas, potenciando a defesa na redução de doenças crónicas (Miccadei *et al.*, 2008).

1.2. *Cynara cardunculus*

Cynara cardunculus L. (Cc) é uma planta herbácea perene, pertencente à família das *Asteraceae compositae*, originária da região do Mediterrâneo, trivialmente apelidada de cardo, que se desenvolve naturalmente em terrenos incultos e áridos, especialmente no sul da Península Ibérica (Falleh *et al.*, 2008). Existem principalmente duas variedades botânicas: a cultivada *Cynara cardunculus* var. *altilis*; e a selvagem ou silvestre *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* (Figura 4) (Comino *et al.*, 2007).

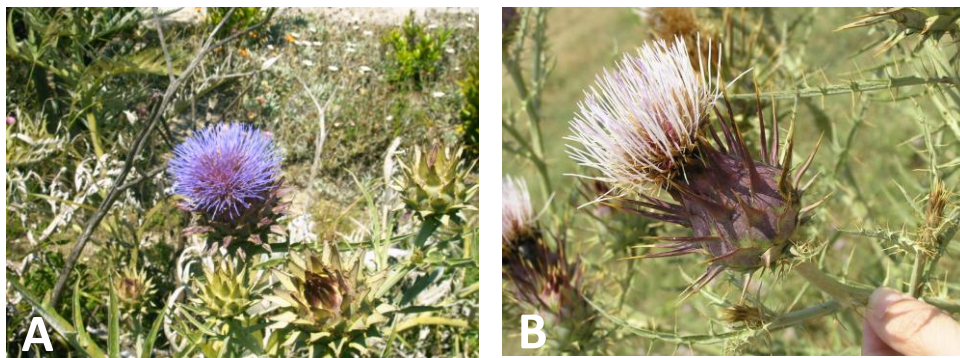


Figura 4: Imagem do aspecto físico de duas variedades diferentes da planta *Cynara cardunculus*. A - *Cynara cardunculus* var. *altilis*; B – *Cynara cardunculus* var. *sylvestris*. (adaptado de <http://www.actaplantarum.org/acta/albums1>)

Tradicionalmente os caules, da variedade silvestre, são utilizados na gastronomia, e as folhas são usadas para infusões, no tratamento, tradicional/popular, de problemas digestivos (Muwaji *et al.*, 2004). As flores da *C. cardunculus* são bastante

ricas em proteases, nomeadamente em cardosinas A e B, sendo por isso utilizadas desde há vários séculos na Península Ibérica para a manufacturação de queijos de ovinos e caprinos (Petrovic *et al.*, 2008). Cc cultivada, é uma planta que pode ainda ser valorizada, do ponto de vista energético, para a extracção de óleos a partir das sementes, utilizado depois como biodiesel (Curt *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2004), sendo a restante biomassa lenhocelulósica utilizada como combustível sólido, para combustão directa (Fernández *et al.*, 2004), pasta de papel, forragem verde para alimentação animal (Fernández *et al.*, 2006) e indústria de produtos farmacêuticos (Fernández *et al.*, 2006) com taxas de rendimento apreciáveis, a custos reduzidos, uma vez que se trata de uma espécie bem adaptada, e pouco exigente (Curt *et al.*, 2006; Raccuia *et al.*, 2007).

A utilização do cardo, na indústria farmacêutica, prende-se com o facto de se tratar de uma espécie que contém quantidades consideráveis de diferentes fitoquímicos biologicamente activos incluindo flavonas, glicósidos, saponinas triterpenóides e ácidos cafeolquínicos (Petrovic *et al.*, 2008). O extracto comercial de silimarina apresenta alguns compostos também presentes em Cc e com grande interesse farmacêutico e económico. Este extracto actua como anti-oxidante, hepatoprotector e inibidor da síntese de colesterol, sendo por isso largamente utilizados pela indústria farmacêutica para o tratamento de diferentes patologias hepáticas (Fernández *et al.*, 2006).

1.2.1. Caracterização do potencial de extractos de *Cynara cardunculus*

Baseado no facto que na região do Alentejo existem quantidades muito apreciáveis de biomassa lenhocelulósica derivada de *Cynara cardunculus*, quer variedade selvagem quer cultivada, (Gominho *et al.*, 2001), o Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral (CEBAL) tem vindo a dedicar muitas das suas linhas de investigação, a novas formas de valorização da biomassa derivada de Cc. De um modo especial o Grupo dos Compostos Bioactivos, tem focado uma grande atenção na caracterização biológica das diferentes fracções extractáveis resultantes das raízes, caules, folhas e flores de plantas frescas *versus* secas, das variedades cultivada e selvagem, possuindo uma bateria de extractos, caracterizados fitoquimicamente, em termos de compostos fenólicos totais e flavonóides De acordo com resultados já estabelecidos pelo grupo de investigação existe uma grande

heterogeneidade entre os diferentes extractos de Cc analisados, sendo que o extracto de folha Cc cultivada fresca (FCF) é o mais rico em termos de quantificação de polifenóis totais e flavonóides, enquanto o extracto de caule Cc cultivado fresco (CCF) apresenta os níveis mais baixos, em termos de quantificação destas duas classes de compostos (Figura 5) (Velez *et al.*, artigo submetido). Adicionalmente foram determinadas as propriedades anti-oxidantes dos vários extractos derivados de raízes, caules, folhas e flores, tendo-se verificado que todos os extractos testados possuem uma significativa capacidade de neutralização de radicais livres, sendo que o extracto da FCF apresenta-se, entre todos os extractos estudados de Cc, potencialmente como o anti-oxidante mais forte. No entanto, quando a análise da capacidade anti-oxidante é efectuada utilizando a mesma quantidade de compostos fenólicos (0,01 a 0,1mg/mL) entre todos os extractos, o extracto CCF apresenta-se como o mais potente, entre todos os extractos, revelando que as diferenças químicas, nomeadamente entre concentrações totais de flavonóides, conferem propriedades biológicas, promovendo certas actividades em detrimento de outras (Velez *et al.*, artigo submetido).

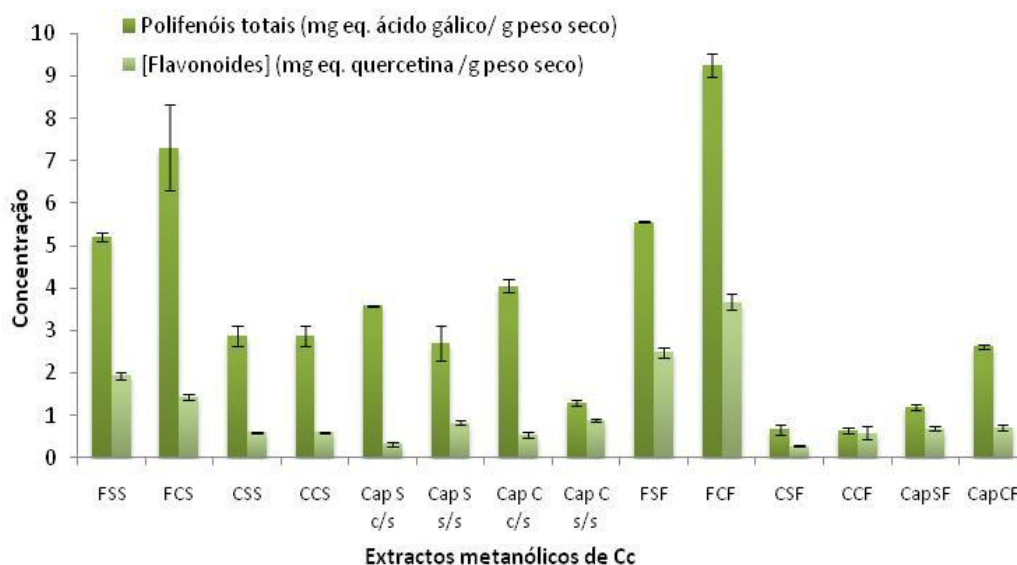


Figura 5: Quantificação dos compostos fenólicos totais e flavonóides em extractos metanólicos de *Cynara cardunculus* variedade cultivada e selvagem. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada pelo método colorimétrico do Folin Ciocalteu, sendo as respectivas concentrações expressas em equivalente de ácido gálico (mg)/g peso seco. Os compostos flavonóides foram quantificados, também, por uma metodologia colorimétrica, baseada no cloreto de alumínio, e os resultados expressos em equivalente de quercetina (mg)/g peso seco. Legenda: FSS – Folha selvagem seca; FCS – Folha cultivada seca, CSS – Caule selvagem seco; CCS – Caule cultivado seco; CS C/S – Capítulo selvagem com semente; CS S/S – Capítulo selvagem sem semente; CC C/S – Capítulo cultivado com semente; CC S/S – Capítulo cultivado sem semente; FSF – Folha selvagem fresca; FCF – Folha cultivada fresca; CSF – Caule selvagem fresco; CCF – Caule cultivado fresco; CapSF – Capítulo selvagem fresco; CapCF – Capítulo cultivado fresco)

2. Oncobiologia

Desde 1990, que a incidência e mortalidade do cancro tem vindo a aumentar significativamente, e entre 1990 e 2000, estima-se que esse valor tenha chegado aos 22%, com 10 milhões de novos casos e mais de 6 milhões de mortes em todo o mundo (Conforti *et al.*, 2008). Na Europa o cancro apresenta-se como um importante problema de saúde pública, com base no reconhecido envelhecimento da população, é possível antecipar que as taxas de incidência e mortalidade irão continuar a aumentar num futuro próximo (Ferlay *et al.*, 2007).

Actualmente, as três principais causas de cancro são: i) dieta desequilibrada; ii) predisposição genética; e iii) as agressões do meio ambiente. Pelo menos 35% de todos os cancros, a nível mundial, têm por base uma dieta desequilibrada, sendo que em alguns casos, como seja o exemplo do cancro do cólon, a percentagem de incidência pode chegar aos 80% (Reddy *et al.*, 2003), obviamente restringindo já a uma subpopulação de indivíduos que não consomem álcool e/ou tabaco, porque nesse subgrupo a percentagem média passa dos 35 para os 60% (Reddy *et al.*, 2003). A predisposição genética representa cerca de 20% de incidência de novos casos de cancro, embora os carcinogéneos ambientais sejam os responsáveis pela grande maioria dos casos (Reddy *et al.*, 2003). Os chamados carcinogéneos incluem, entre outros, a radiação ultravioleta (UV), vírus, e compostos químicos naturais ou produzidos pelo Homem, como as aflotoxinas, nitrosaminas, gorduras saturadas e óleos, álcool, aditivos e conservantes. É efectivamente na dieta, que estes carcinogéneos encetam a primeira fase do processo de crescimento tumoral (Reddy *et al.*, 2003). A combinação de certos alimentos pode resultar num efeito cumulativo, e concomitantemente uma dieta desequilibrada associada a outros factores de risco, como poluição ambiental, exposição excessiva a radiações UV, falta de exercício físico e *stress*, representam uma maior predisposição para o desenvolvimento das fases iniciais do processo carcinogénico (Reddy *et al.*, 2003).

A contribuição da fitoterapia para o tratamento tumoral, entre 1940 e 2002, corresponde a cerca de 40% de todos os fármacos comercializados, sendo que 8% representam compostos obtidos a partir de modificações realizadas directamente em produtos extraídos de plantas (Newman *et al.*, 2003). Com base nestes dados, a fitoterapia tem surgido como nova esperança no universo da prevenção e tratamento de

diversas doenças oncológicas. Progressos importantes foram conseguidos em termos de tratamento de diferentes tipos de tumores, com recurso à quimioterapia. Alguns estudos e/ou ensaios clínicos demonstram, claramente, que uma parcela significativa destes avanços podem ser atribuídos, a vários compostos extraídos e/ou derivados sinteticamente de diferentes plantas (Conforti *et al.*, 2008). O aumento do risco de cancro e a baixa toxicidade associadas com a ingestão de produtos naturais sugere que concentrações específicas de fitoquímicos provenientes de certas plantas podem proporcionar efeitos quimiopreventivos, muito interessantes do ponto de vista biológico, sem atingir níveis de toxicidade preocupantes. Estima-se que a quimioprevenção poderá representar um “tratamento” mais eficaz, em que cerca de 2/3 de todos os cancros humanos poderiam ser prevenidos por modificações no estilo de vida, incluindo os hábitos alimentares (Sarkar *et al.*, 2004) Os compostos fitoquímicos apresentam uma grande capacidade anti-inflamatória, a qual está na génese da grande maioria das transformações neoplásicas, nomeadamente no excesso de proliferação celular, e no mecanismo de angiogénese tumoral (Thangapazham *et al.*, 2007; Ramasamy *et al.*, 2008). Alguns estudos sugerem a utilização de vários agentes dietéticos, sozinhos ou combinados com agentes terapêuticos tradicionais para prevenir o aparecimento do cancro, metastização e até mesmo como agente de tratamento (Ramasamy *et al.*, 2008).

O processo de carcinogénese resulta de um desequilíbrio na homeostasia celular. Num tecido estável adulto as taxas de replicação e morte celular apresentam-se equilibradas, no entanto, em certas circunstâncias, como seja o caso do desenvolvimento tumoral, a taxa de proliferação celular pode exceder significativamente a taxa de apoptose, resultando no aparecimento, do que se designa, em contexto tumoral, por uma hiperplasia (Archivio *et al.*, 2008). Sendo a proliferação celular regulada por moléculas guardiãs das principais etapas do ciclo celular, o aumento ou diminuição destes reguladores pode, por si só, estar na base de uma resposta proliferativa excessiva e não controlada, característica do processo carcinogénico. Por outro lado, e uma vez que os mecanismos apoptóticos promovem a eliminação de células com respostas inadequadas, representando, uma protecção importante contra a transformação neoplásica e subsequente desenvolvimento tumoral, o controlo quer da resposta proliferativa quer da resposta apoptótica representam importantes mecanismos de controlo celular.

2.1. Proliferação tumoral

A carcinogénese tem três etapas principais: iniciação, promoção e progressão (Reddy *et al.*, 2003). A fase de iniciação relaciona-se em grande parte com os mecanismos celulares de defesa face às agressões externas, como seja o caso dos agentes carcinogénicos e mutagénicos. A imprópria resposta celular, a estes factores de risco, conduz à acumulação de danos oxidativos, especialmente a nível do ácido desoxirribonucleico (ADN), aumentando a susceptibilidade para ocorrência de mutações (Liu, 2004). A divisão de células com sequências de ADN mutado poderá resultar numa alteração genética permanente, constituindo o primeiro passo no processo carcinogénico (Reddy *et al.*, 2003).

A fase de promoção tumoral é caracterizada pela proliferação celular, induzida pela activação e/ou sobre-expressão de enzimas envolvidas na síntese de nucleótidos e do ADN, bem como na regulação dos processos de diferenciação. Durante a fase de promoção, existem duas sub-fases, uma primeira em que o organismo apresenta uma sobre-produção de diferentes espécies reactivas de oxigénio (ROS), sobretudo devido à sobre-expressão de enzimas pró-oxidantes, induzindo um aumento de mutações a nível do ADN, bem como outros danos celulares, incrementado a susceptibilidade celular, e consequentemente uma resposta anti-proliferativa menos eficaz (Reddy *et al.*, 2003). A segunda sub-fase ocorre de forma bastante lenta, durante um período que, temporalmente, se pode estender durante vários anos, mas em que a presença de factores de risco, como seja o caso de dietas desequilibradas podem acelerar o desenvolvimento da doença oncológica (Reddy *et al.*, 2003).

Prevenir a fase de iniciação é uma importante e promissora estratégia para combater o cancro (Reddy *et al.*, 2003). Vários polifenóis, com efeito protector, podem interromper ou desacelerar o processo de carcinogénese, actuando em reguladores da sinalização intracelular, envolvidos nas etapas de iniciação e/ou progressão, controlando a expressão de várias proteínas chave envolvidas em diversas vias de transdução de sinal como a regulação da proliferação celular, a diferenciação, a apoptose, a angiogénese ou metastização (Ramos, 2008). Paralelamente, a actividade anti-tumoral destes compostos pode ser atribuída, também, a um efeito duplo, em que por um lado as células normais são mais protegidas, e em simultâneo as células neoplásicas são alvo de um efeito citotóxico (Ramos, 2008). A forma como os polifenóis regulam e induzem

estes efeitos benéficos no processo de carcinogénese continua ainda por ser elucidada, especialmente a nível da regulação molecular.

2.2. Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a quinta neoplasia mais frequente em termos mundiais, representando cerca de 500 000 mortes por ano (Figura 6). As percentagens de incidências deste tipo de tumor estão a aumentar quer na Europa quer nos Estados Unidos (El-Serag, 2004; Bosetti *et al.*, 2008) devido, em grande parte, aos estilos de vida. Em algumas regiões Asiáticas e sub-Saharanas, o CHC continua a ser a principal causa de morte em adultos, por cancro. Estudos epidemiológicos identificam vários factores de risco para o CHC, sendo que o desenvolvimento deste tipo de tumor no Ocidente relaciona-se, em 90% dos casos, com a presença de cirrose hepática (Mazzanti *et al.*, 2008). Outros factores de riscos incluem o consumo abusivo de álcool, intoxicação por Aflotoxina B₁ e doenças genéticas como hemocromatose e diabetes, bem como infecções crónicas por hepatite viral (Mazzanti *et al.*, 2008). Recentemente, a variabilidade geográfica da incidência de CHC tem vindo a mudar, devido às mudanças na distribuição das infecções pelo vírus da hepatite B e C (Gomaa *et al.*, 2008).

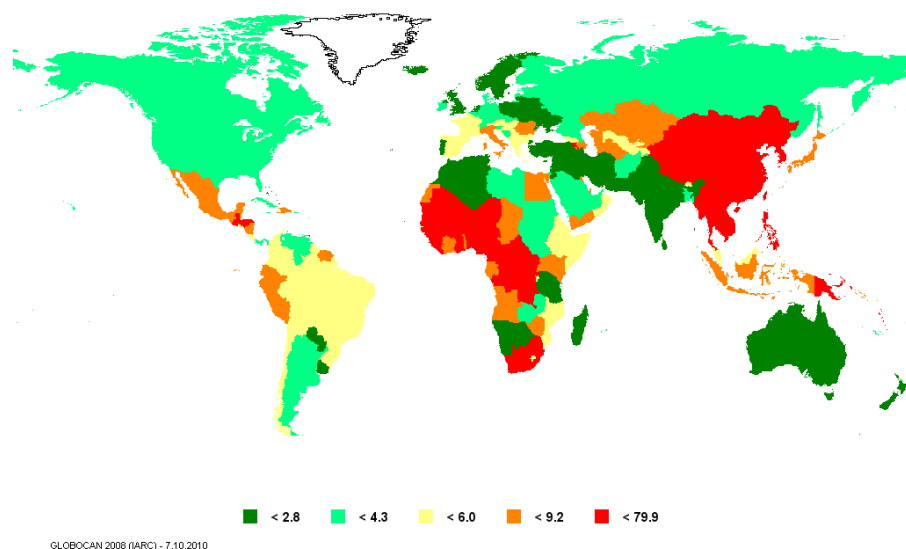


Figura 6: Taxa mundial de, mortalidade por HCC. As taxas reportam-se a 100.000 indivíduos de ambos os sexos, abrangendo todas as faixas etárias (adaptado de GLOBOCAN 2008).

O diagnóstico do CHC, durante várias décadas, foi realizado, apenas, com a apresentação sintomática da doença. A identificação de grupos de risco e o desenvolvimento de programas de diagnóstico precoce permitiram uma mais eficiente detecção deste tipo de carcinomas, diminuindo consideravelmente as taxas de mortalidade, e, simultaneamente, aumentando o número de indivíduos com prognóstico favorável (Mazzanti *et al.*, 2008). Hoje em dia, o transplante hepático e a ressecção cirúrgica constituem as opções terapêuticas mais viáveis para doentes com CHC. No entanto, apenas são aplicáveis a uma pequena fracção de pacientes, uma vez que a maioria dos casos sujeitos a ressecção, apresentam risco aumentado de recorrência (Poon *et al.*, 2004). O CHC continua a ser dos poucos tumores nos quais a quimioterapia convencional não é efectiva.

2.2.1. Potencial dos compostos fitoquímicos na prevenção e/ou tratamento do carcinoma hepatocelular

As opções limitadas de tratamento e o prognóstico desfavorável para este carcinoma salientam a importância da quimioprevenção e o desenvolvimento de novas terapias, recorrendo à utilização de compostos fitoquímicos. Vários estudos, utilizando diferentes modelos (*in vitro* e *in vivo*), têm vindo a demonstrar que diversos fitoquímicos, incluindo a curcumina, resveratrol, catequinas e silibina possuem promissoras propriedades quimiopreventivas e quimioterapêuticas no CHC (Mann *et al.*, 2009). Além do mais, está extensamente demonstrado o efeito quimiopreventivo no cancro da próstata e da pele da silimarina (Tyagi *et al.*, 2002; Deep *et al.*, 2007), um flavolignano, extraído de *Silybum marianum*, planta pertencente à mesma família que *Cynara cardunculus*.

A procura de novos compostos, com grande potencial biológico, para a quimioprevenção, será de extrema importância no tratamento de cancros cujas terapias actualmente disponíveis são insatisfatórias. Assim, o CHC poderá ser um dos tumores que beneficiará da potencial quimiopreventivo e/ou quimioterapêutico proporcionado por diferentes produtos naturais.

2.3. Cancro da Mama

O cancro da mama é a principal causa de morte por cancro em mulheres em todo o mundo, com cerca de 411 000 mortes por ano, e aproximadamente 1,2 milhões de mulheres diagnosticadas em todo o mundo (Dumitrescu *et al.*, 2005) (Figura 7). Na Europa estima-se que anualmente cerca de 85 000 mulheres morrem com este tipo de tumor (Ferlay *et al.*, 2007). Em Portugal, o cancro da mama representa o carcinoma com taxas de incidência e mortalidade mais elevada para o sexo feminino (Dumitrescu *et al.*, 2005; Gaudet *et al.*, 2006). Durante as últimas décadas, a mortalidade global diminuiu não só em Portugal, mas em todos os países desenvolvidos, o que se deveu principalmente aos efeitos combinados no diagnóstico precoce e das novas metodologias de tratamento.

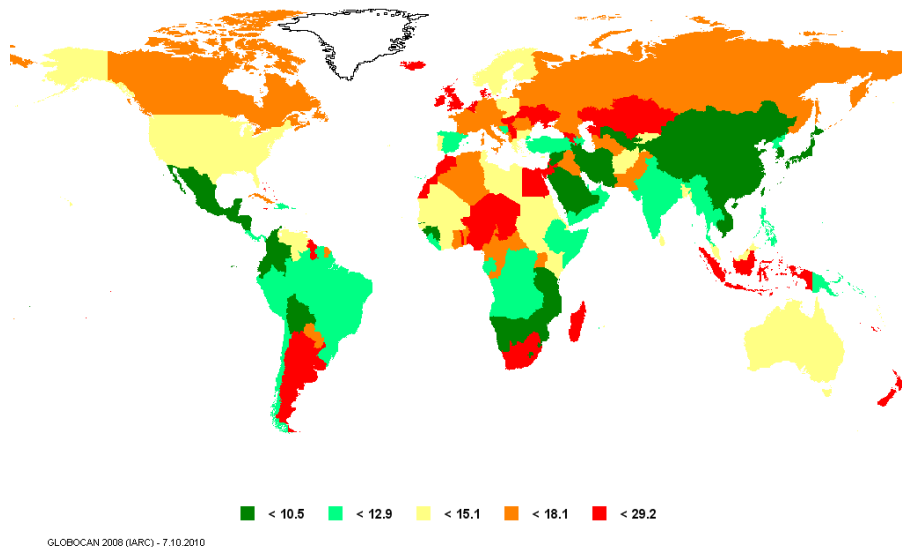


Figura 7: Taxa mundial de mortalidade por cancro da mama. As taxas reportam-se a 100.000 indivíduos do sexo feminino e a todas as faixas etárias (adaptado de GLOBOCAN 2008).

O cancro da mama representa por si só um grupo extremamente heterogéneo de tumores, com diferentes propriedades celulares e moleculares, e consequentemente diferenças significativas na resposta ao tratamento (Rakha *et al.*, 2007). Até muito recentemente, o cancro da mama era subclassificado com base na morfologia celular e na presença de diversos receptores, identificados por imunohistoquímica, nomeadamente o receptor de estrogénio (RE), o receptor de progesterona (RPg) e a

expressão do receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano (HER2) (Cleator *et al.*, 2007). A análise da expressão génica permitiu a reclassificação deste tipo de tumores (Reis-Filho *et al.*, 2008), passando-se a considerar cinco tipos distintos de cancro da mama: i) dois grupos positivos para RE, designados como subtipos luminais (A e B), devido às características partilhadas com as células epiteliais luminais decorrentes da camada interna do revestimento do ducto; ii) um grupo que sobre-expressa o gene *HER2*; e iii) um grupo caracterizado pela alta expressão de genes de células epiteliais basais e baixa expressão de genes de células epiteliais luminais (Cleator *et al.*, 2007). O quinto grupo apresenta negatividade para o RE, o RPg e para *HER2*, designados por triplo negativos (Cleator *et al.*, 2007; Reis-Filho *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2008).

Apesar, de o cancro da mama com fenótipo de tripla negatividade representar apenas cerca de 10-15% de todos os casos de cancro da mama (Adams *et al.*, 2010), este subgrupo de carcinomas mamários apresenta uma das mais elevadas taxas de mortalidade (Schneider *et al.*, 2008), sendo caracterizado por um historial clínico muito agressivo, com um prognóstico bastante desfavorável e uma alta taxa de metástases, em órgãos vitais, como por exemplo o cérebro (Cleator *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2010). Actualmente não existe um modelo de tratamento definido, os pacientes são em geral altamente refractários à quimioterapia tradicional, com a agravante que as taxas de reincidência são muito elevadas. Até ao presente, os avanços no tratamento têm sido muito restritos, com uma quantidade de informação muito limitada relativamente a estratégias de prevenção (Adams *et al.*, 2010). Sendo, por isso, premente o desenvolvimento de novas estratégias de quimioprevenção e tratamento para este subtipo de cancro da mama.

2.3.1. Potencial dos compostos fitoquímicos na prevenção e/ou tratamento do cancro da mama

Estudos desenvolvidos pela equipa de Damianaki e colaboradores sugerem que pequenas concentrações de polifenóis podem ter um efeito benéfico anti-proliferativo em células de cancro da mama (Damianaki *et al.*, 2000). Estudos epidemiológicos evidenciam que a ingestão de duas classes de flavonóides (flavonas e flavonóis)

(Peterson *et al.*, 2003; Bosetti *et al.*, 2005) diminui o risco de desenvolvimento de cancro da mama. Por outro lado, está demonstrado que o resveratrol, e a curcumina exibem um efeito inibitório/apoptótico em células metásticas do cancro da mama (MDA-MB-231) (Scarlatti *et al.*, 2003 Rowe *et al.*, 2009). O cancro da mama com fenótipo de tripla negatividade, apesar de não representar um número elevado de casos, comparativamente a outros tipos de carcinoma mamário, tem um prognóstico bastante desfavorável, o que realça a importância do desenvolvimento de novas terapias, nomeadamente a utilização de compostos naturais com grande potencial biológico.

3. Via molecular do PI3K/AKT/mTOR

A activação de fosfatidilinositol cinases (PI3Ks) é uma das mais importantes vias de transdução de sinal utilizada por diferentes receptores de membrana para controlar eventos intracelulares (Hawkins *et al.*, 2006). Estas cinases são por isso consideradas excelentes alvos terapêuticos estando a ser alvo de estudo em diversos contextos patológicos (Grey *et al.*, 2010). A cinase de serina/treonina denominada AKT, também conhecida por proteína cinase B (PKB) surge como uma molécula central de sinalização em todas as células de eucariotas, e uma das mais importantes e versáteis cinases no centro da fisiologia e patologia humana (Manning *et al.*, 2007).

A via de sinalização do PI3K/AKT/mTOR é activada por diferentes tipos de estímulos celulares ou tóxicos e regula fundamentalmente funções celulares como a transcrição, a tradução, a proliferação, e a sobrevivência (Osaki *et al.*, 2004). Alterações na activação da via PI3K/AKT/mTOR estão associadas com o desenvolvimento de diversas patologias como a diabetes mellitus doenças autoimunes, e o crescimento tumoral (Osaki *et al.*, 2004). O desenvolvimento e progressão do cancro, como já referido, está associado, na grande maioria dos casos, a um desequilíbrio entre o excesso de proliferação celular e a falta de resposta apoptótica, dois processos intimamente ligados à via do PI3K/AKT/mTOR.

3.1. PI3K

As cinases 3-fosfatidilinositol (PI3K) caracterizam-se por fosforilar substratos com fosfatidilinositol, gerando produtos polares lipídicos, sendo por isso denominadas de cinases lipídicas, que activam vias de sinalização comuns a processos celulares essenciais (Grey *et al.*, 2010). O enzima PI3K catalisa a adição de um grupo fosfato na posição D-3 de lípidos de fosfatidilinositol, formando diferentes produtos 3' fosforilados que actuam como mensageiros secundários (Hirsch *et al.*, 2008).

3.1.1. Descrição das várias classes do PI3K

De acordo com a sua sequência de homologia, bem como a preferência pelo substrato, o PI3K pode ser dividido em três classes distintas: I, II e III (Figura 8) (Hirsch *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008).

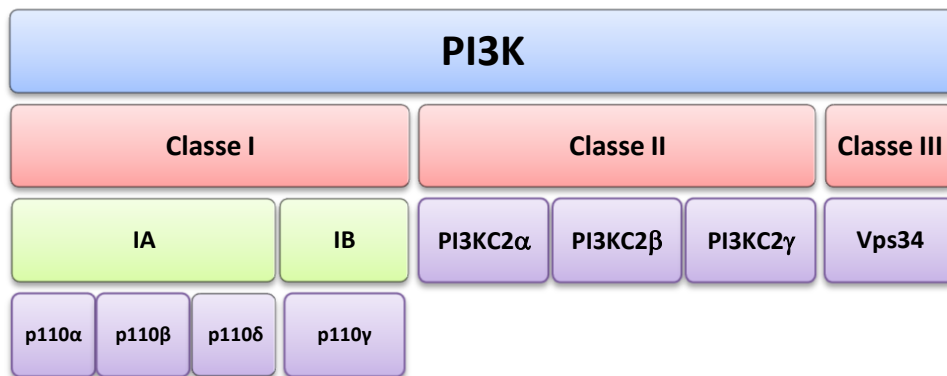


Figura 8: Representação esquemática das diferentes classes da cinase 3-fosfatidilinositol: classe I, II e III. Identificação das subclasses IA e IB com identificação das respectivas subunidades catalíticas p110 α , β , e δ , e p110 γ respectivamente.

A classe I do PI3K consiste em enzimas heterodiméricas, com uma subunidade reguladora acoplada a uma subunidade catalítica de 110 kDa (Foukas *et al.*, 2010). Quatro genes distintos, *Plk3ca*, *Plk3cb*, *Plk3cd* e *Plk3cg*, codificam as subunidades catalíticas p110 α , p110 β , p110 δ e p110 γ (Hirsch *et al.*, 2008). Dependendo da sua associação com as subunidades reguladoras, e respectivos mecanismos de activação, a

classe I do PI3K pode ainda ser dividida em dois subgrupos, IA e IB (Foukas *et al.*, 2006; Grey *et al.*, 2010). A subclasse IA compreende as subunidades catalíticas p110 α -, β -, e δ -, associadas à família de proteínas p85 (p85 α p85 β , p55 γ , p55 α ou p50 α), sendo activadas por receptores com actividade tirosina cinase (RTK) (Hirsch *et al.*, 2008). Todas as subunidades reguladoras possuem uma região de ligação à subunidade p110, flanqueada por dois SH2 (domínios de homologia SRC2), essenciais na mediação da activação da classe IA por RTKs (Figura 9) (Osaki *et al.*, 2004). O único membro da classe IB, PI3K γ , é única e exclusivamente activado pelos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Figura 10), podendo-se ligar especificamente a adaptadores não relacionados à família p85, bem como a subunidades reguladoras como a p101 ou a p84 (Hirsch *et al.*, 2008). Estas subunidades reguladoras facilitam a interacção das subunidades G $\beta\gamma$ com proteínas G heterotriméricas, apesar de estar também descrita a activação de PI3K γ directamente por ligação do p110 γ às subunidades G $\beta\gamma$ (Brock *et al.*, 2003). Apesar da exclusiva ligação da classe IB PI3K γ às GPCRs, estudos indicam que também p110 β da classe IA PI3K pode ser activada por subunidades $\beta\gamma$ da proteína G, podendo, assim, funcionar por integração dos sinais das cascatas de sinalização de GPCR e RTK (Hirsch *et al.*, 2008).

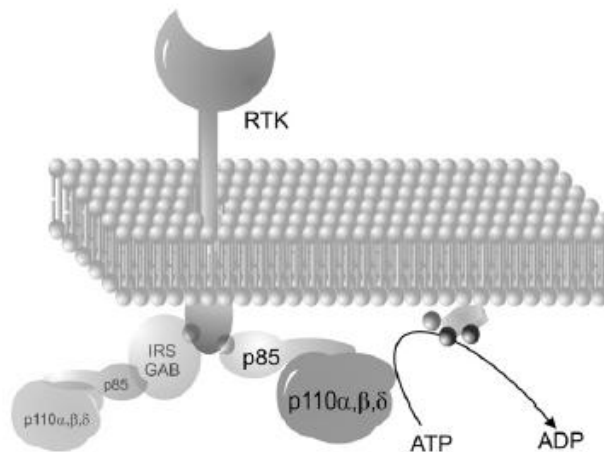


Figura 9: Mecanismo de activação da classe IA do PI3K pelos receptores RTK. Referência para as subunidades catalíticas p110 α , β , e δ em associação com a subunidades reguladoras p85 (adaptado de Hirsch *et al.*, 2008).

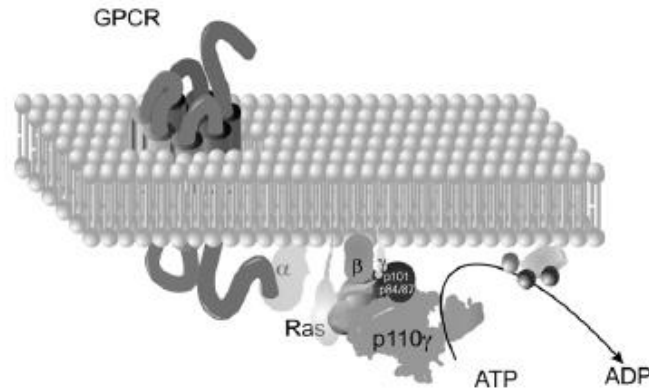


Figura 10: Mecanismo de activação da classe IB do PI3K pelos receptores de membrana GPCR. Referência para a subunidade catalítica p110 γ (adaptado de Hirsch *et al.*, 2008).

A classe II do PI3K engloba três genes diferentes partilhando uma significativa homologia de sequência com as subunidades p110 da classe I do PI3K. *PIk3c2a*, *PIk3c2b* e *PIk3c2c* codificam, respectivamente, uma distinta subunidade catalítica p110 que, ao contrário do que acontece na classe I, não está associada a qualquer subunidade reguladora (Hawkins *et al.*, 2006).

Por sua vez, a classe III do PI3K constituída por um único membro, Vps34 (*vacuolar protein-sorting defective 34*). Este enzima funciona como um heterodímero com uma subunidade catalítica Vps34, associada a uma subunidade reguladora p150 (Hawkins *et al.*, 2006).

3.2. AKT

A via do AKT foi inicialmente caracterizada com o isolamento de dois genes *Akt1* e *Akt2*, homólogos do oncogene viral *v-akt*, responsável por um subgrupo específico de leucemias. Após a identificação dos homólogos humanos a caracterização proteica revelou grande semelhança com a proteína cinase C e A (PKC) (PKA), respectivamente, sendo então posteriormente denominada de AKT, constituído por três membros: AKT1, AKT2 e AKT3 (Manning *et al.*, 2007).

3.2.1. Papel da AKT na regulação de diferentes mecanismos celulares

A AKT é uma proteína central na activação/modulação de vários substratos envolvidos na regulação da proliferação celular e sobrevivência, tamanho celular e resposta à disponibilidade de nutrientes, metabolismo da glucose, estabilidade genómica e angiogénese (Figura 11) (Testa *et al.*, 2005; Manning *et al.*, 2007). A fosforilação induzida pelo AKT tem efeitos em diferentes contextos celulares, por exemplo: i) a AKT fosforilada (pAkt) inactiva factores pró-apoptóticos BAD (que controla a libertação do citocromo C da mitocôndria) e Pró-caspase-9 (processada pelo citocromo C) (Altomare *et al.*, 2005); ii) activa, por fosforilação, reguladores positivos da via do NF_{KB}, responsável pela expressão e regulação de genes anti-apoptóticos (Dillon *et al.*, 2007); iii) inactiva os factores de transcrição FOXO, os quais mediam a expressão de genes críticos para a apoptose, como o gene *ligando Fas* (Testa *et al.*, 2005); iv) promove a fosforilação e a translocação da proteína Mdm2 para o núcleo, inibindo a transcrição dependente da proteína p53, devido à formação de complexos Mdm2/p53 (Mayo *et al.*, 2001); v) antagoniza a acção de inibidores das ciclinas do ciclo celular, nomeadamente, p21^{WAF1} e p27^{Kip1} induzindo uma resposta proliferativa não controlada (Altomare *et al.*, 2005); vi) induz a activação da cinase mTOR também envolvida na regulação do crescimento celular (Testa *et al.*, 2005); vii) desempenha um importante papel na indução da angiogénese (Dillon *et al.*, 2007; Faivre *et al.*, 2007); viii) actua no processo de invasão e metastização, através da activação de metaloproteinases responsáveis pela degradação da matriz extracelular (Dillon *et al.*, 2007). A desregulação da via do AKT desempenha assim um importante papel, em diversos mecanismos relacionados com o desenvolvimento tumoral. A expressão aumentada do AKT permite à célula tumoral uma resposta “pró-tumoral”, muito mais eficaz face a vários estímulos.

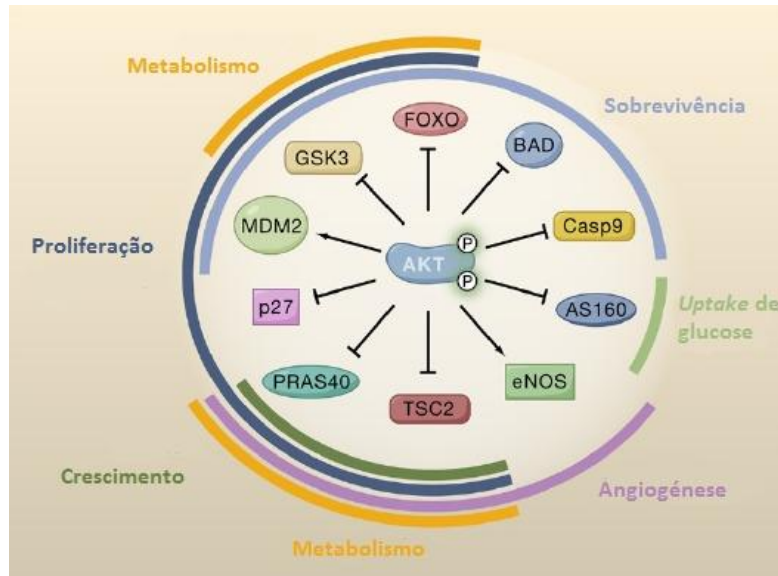


Figura 11: Representação esquemática de algumas das funções celulares da via do AKT. Destaque para a envolvimento da via na resposta à proliferação, ao metabolismo, sobrevivência e resposta angiogénica face a certos substratos (adaptado de Manning *et al.*, 2007).

3.3. mTOR

A proteína alvo da rapamicina (*mammalian target of rapamycin* (mTOR)) é uma proteína citoplasmática identificada como o alvo celular deste antibiótico macrocíclico (Asnaghi *et al.*, 2004; Tee *et al.*, 2005). A proteína mTOR, codificada pelo gene *FRAP1*, trata-se de uma cinase serina/treonina que regula diferentes mecanismos celulares, entre eles, a proliferação, a motilidade, a transcrição e a síntese proteica (Tee *et al.*, 2005). mTOR pertence à família de proteínas das cinases 3-fosfostadilinositol integrando diferentes estímulos de vários factores de crescimento (Hay, 2004), sendo sensível a diferentes nutrientes e níveis de energia celular, bem como ao estado redox (Tokunaga *et al.*, 2004).

3.3.1. Papel do mTOR na regulação de diferentes mecanismos celulares

O mTOR é o domínio catalítico de dois complexos moleculares: o Complexo 1 mTOR (mTORC1) e o Complexo 2 mTOR (mTORC2). O mTORC1 é constituído pelo mTOR, associado à proteína reguladora do mTOR (Raptor), entre outras proteínas (Sarbasov *et al.*, 2002; Sarbasov *et al.*, 2004). Este complexo funciona como um sensor de nutrientes/energia controlando a síntese proteica (Lopiccolo *et al.*, 2008), sendo a sua actividade regulada, em grande parte, a nível hormonal, é também induzida pela insulina, factores de crescimento, diferentes aminoácidos (em particular a leucina), e condições de stress oxidativo (Fang *et al.*, 2001). O mTORC2 é composto pelo mTOR associado ao domínio rapamicina do mTOR (Rictor), e mais duas proteínas (mSIN1), este complexo é de extrema importância para a regulação do citoesqueleto, através da activação das fibras de stress da F-actina, bem como outras proteínas, nomeadamente, RhoA, Rac1 envolvidas na organização espacial celular (Sarbasov *et al.*, 2004). O equilíbrio entre o mTORC1 e o mTORC2, mais especificamente entre o mTOR-Raptor e mTOR-Rictor, actua como um mecanismo de “*feed-back*” para a inibição do AKT pelo mTOR TORC (Lopiccolo *et al.*, 2008), ou seja, quando o complexo mTORC1 é formado, a quantidade de mTORC2 diminui, levando, conseqüentemente, a um decréscimo de pAKT (treonina 308), o que por sua vez leva a uma redução na activação da via do AKT (Figura 12) (Stephens *et al.*, 1998; Sarbasov *et al.*, 2005)

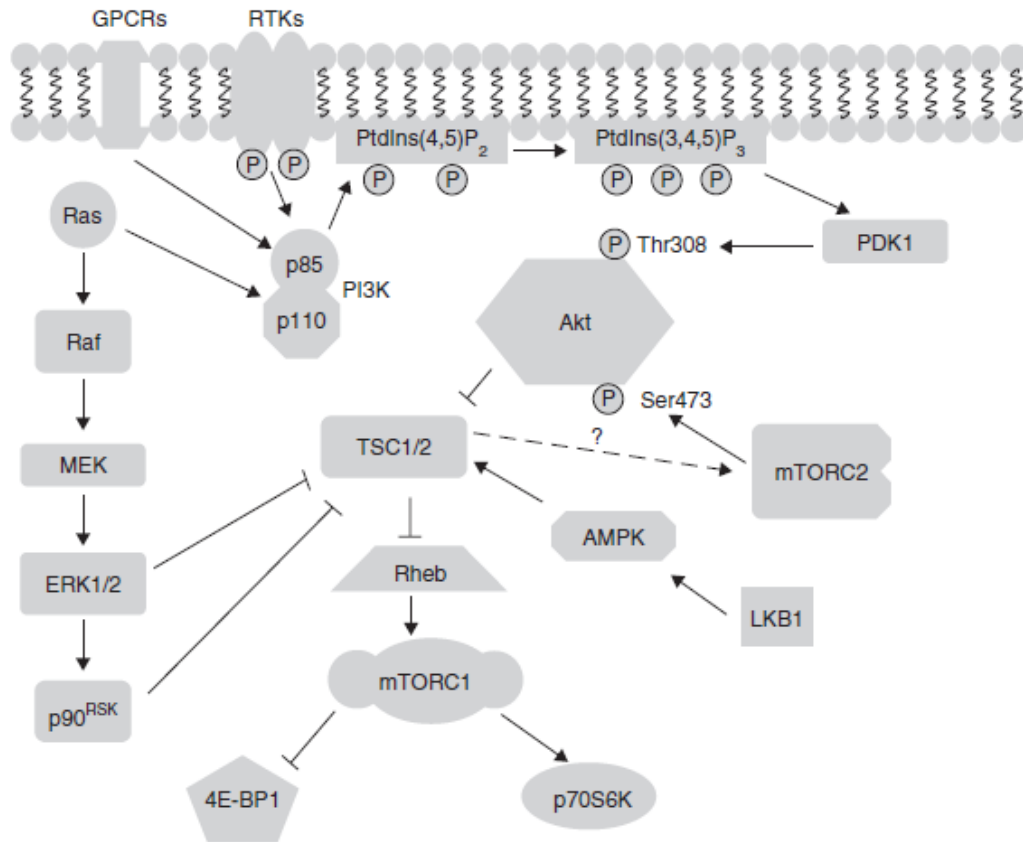


Figura 12: Representação esquemática da via molecular do PI3K/AKT/mTOR com destaque para as subunidades catalíticas e reguladoras do PI3K (p110 e p85), os locais de fosforilação da proteína AKT (pAKT Thr308 e Ser473), bem como os complexos proteicos mTORC1 e mTORC2 em contexto de activação dos receptores de membrana GPCRs e RTKs (adaptado de Martelli *et al.*, 2009).

3.4. Envolvência da via do PI3K/AKT/mTOR na regulação da resposta tumoral

Diversos componentes da via PI3K/AKT/mTOR estão frequentemente desregulados no cancro. A subunidade catalítica p110 α , da classe IA do PI3K está mutada num número considerável de tumores em humanos, nomeadamente hepático e mama (Bachman *et al.*, 2004; Campbell *et al.* 2004; Lee *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Carnero, 2009).

A activação da sinalização de AKT e diminuição da expressão de PTEN têm sido descritas em cerca de 40%-60% dos casos de CHC (Sakamoto *et al.*, 2004). A activação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR está envolvida na invasão e metastização, através da regulação de MMP-9 (Chen *et al.*, 2009).

O modo mais comum de activação da via do PI3K no cancro da mama é via receptores de membrana, nomeadamente, receptores de estrogénio (RE) e HER2. Cerca de 25%-30% dos casos apresentam, para além da amplificação do gene *HER2*, mutações activas no gene *PIK3CA* que codifica para a subunidade catalítica p110 α , e em 10% dos casos, há perda de expressão de um dos reguladores negativos da via, *PTEN* (Myers *et al.*, 2010), levando a uma permanente activação da via do PI3K. O AKT está frequentemente amplificado e/ou mutado no carcinoma mamário, sendo que o AKT1 desempenha um papel importante na indução deste tipo de cancro e o AKT2 está principalmente envolvido na disseminação metastática (Dillon *et al.*, 2010).

3.4.1. Inibidores da via do PI3K/AKT/mTOR com potencial aplicação oncológica

Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento dos agentes terapêuticos que inibem os componentes chave da via do PI3K/AKT/mTOR e muitos destes encontram-se já em ensaios clínicos (Yap *et al.*, 2008). É, então, imperativo que agentes efectivos com potencial para maximizar o benefício, para o paciente, e minimizar a toxicidade sejam cuidadosamente seleccionados e aprovados.

Os inibidores da via do PI3K, LY294002 e Wortmanina, ambos actuando na subunidade catalítica p110, têm sido utilizados como ferramentas de investigação para explicar o valor do PI3K como potencial alvo terapêutico. O LY294002 é um inibidor competitivo numa gama de concentrações baixa (Figura 13). LY294002 apesar de apresenta um largo espectro de actividades, não foi até ao presente testado em ensaios clínicos, devido às suas propriedades farmacocinéticas e toxicidade (Yap *et al.*, 2008) (Carnero, 2009). O inibidor LY294002 é significativamente menos potente para a classe I do PI3K, quando comparado com um outro inibidor da mesma via denominado Wortmanina (Figura 14), com uma concentração inibitória (IC₅₀) na série de concentrações 1-20 $\mu\text{mol/L}$ (Carnero, 2009).

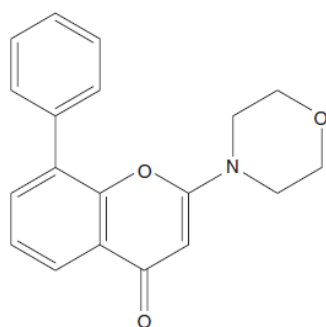


Figura 13: Representação esquemática da estrutura química do inibidor da via do PI3K - LY294002 (adaptado de Carnero, 2009).

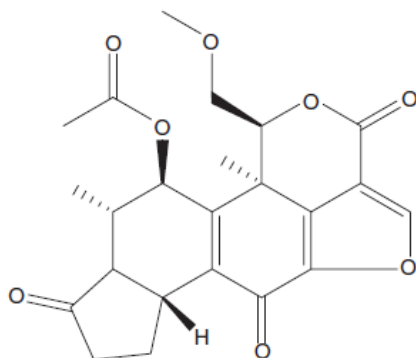


Figura 14: Representação esquemática da estrutura do inibidor, da via do PI3K - Wortmanina (adaptado de Carnero, 2009).

Apesar do incontornável papel da Wortmanina e do LY294002 na compreensão da função molecular da via do PI3K, o seu uso em ensaios clínicos está comprometido devido à baixa selectividade, incapacidade de discriminar entre diferentes isoformas de PI3K e ainda elevada toxicidade (Hirsch *et al.*, 2008). Na tentativa de aumentar a selectividade destes agentes, alguns estudos apontam para uma segunda geração de inibidores, dos quais fazem parte compostos como o PI-103, que inibe todas as isoformas da classe I do PI3K e ainda o mTOR (Hirsch *et al.*, 2008). Estão ainda a ser testados compostos que inibam diferencialmente as várias isoformas do PI3K, como o TGX- 115, o qual bloqueia preferencialmente p110 β , ou o PIK-90, bloqueador preferencial da subunidade p110 α (Hirsch *et al.*, 2008).

Diversas classes de pequenas moléculas inibidoras de AKT têm sido desenvolvidas, na perspectiva de especificamente bloquearem os diferentes membros da família AKT. Estes inibidores incluem análogos de fosfatidilinositol, moléculas competitivas para adenosina trifosfato (ATP), pseudosubstratos para AKT e inibidores alostéricos (Yap *et al.*, 2008). A rapamicina e os seus análogos, temsirolimus, everolimus e deforolimus, os quais inibem a cinase de mTOR, têm sido referenciados como inibidores eficazes no tratamento do carcinoma mamário e hipernefoma (Vignot *et al.*, 2005). Estes compostos ligam-se a uma proteína intracelular, a FKBP-12, formando um complexo, o qual inibe a sinalização via mTOR. Estes inibidores demonstram uma actividade anti-proliferativa e anti-tumoral, quer *in vitro* ou *in vivo* em tumores sólidos, demonstrando uma actividade sinérgica com a quimioterapia convencional, como o Paclitaxel e agentes hormonais como o Tamoxifen (Yap *et al.*, 2008).

3.5. Efeito de compostos fitoquímicos na regulação da via do Pi3K/AKT/mTOR

Os polifenóis provenientes da dieta desempenham uma extensa lista de actividades biológicas, podendo, em termos celulares, afectar todas as fases da carcinogénese regulando a expressão de várias proteínas chave envolvidas em diversas vias de transdução de sinal, como a regulação da proliferação celular, a diferenciação, a apoptose, a angiogénese ou metastização, resultando num potencial efeito anti-tumoral (Ramos, 2008).

Diversos estudos salientam o potencial de vários polifenóis na via do PI3K/AKT/mTOR. Polifenóis como o Epigallocatequina-3-galato (ECGC), curcumina e resveratrol inibem a via do PI3K em diversos tipos de cancro, principalmente por diminuição do nível de pAKT (Siddiqui *et al.*, 2004; Beevers *et al.*, 2006; Pozo-Guisado *et al.*, 2004). Flavonóides como a apigenina, luteolina, fisetina e quercetina apresentam o mesmo tipo de efeito na AKT, induzindo assim a inibição da via do PI3K/AKT/mTOR (Garg *et al.*, 2005; Granada-Serrano *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Ramos, 2008; Chien *et al.*, 2009)

Actualmente não existe nenhum estudo sobre o efeito de extractos de *Cynara cardunculus* na via do PI3K/AKT/mTOR. Chen e colaboradores destacaram o efeito da silibinina, um flavonóide extraído de *Silybum marianum*, pertencente à família do cardo, na inibição desta via (Chen *et al.*, 2005). A caracterização biológica do efeito de extractos naturais, na via do PI3K/AKT/mTOR esta ainda pouco explorada, destacando-se estudos como o de Adams e colaboradores, que ressalta o efeito do extracto metanólico do fruto mirtilo (*Vaccinium corymbosum*), rico em polifenóis, na modulação da via do PI3K/AKT/mTOR (Adams *et al.*, 2010). Este estudo foi realizado com células de cancro da mama, de fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231), demonstrando que a presença deste extracto induz uma diminuição dos níveis de pAKT, e consequentemente um abrandamento na activação da via do PI3K/AKT/mTOR (Adams *et al.*, 2010).

A actividade biológica de um dado extracto não é, em geral, devido a um único elemento, mas sim a uma mistura de componentes, pertencentes a diversas classes de compostos, como polifenóis, aminoácidos, ácidos orgânicos, glúcidos e sais minerais. Estes compostos actuam de modo sinérgico, aumentando, na grande maioria dos casos, as potencialidades biológicas que esse mesmo extracto poderá desempenhar num certo contexto, quando comparado com a utilização isolada dos seus vários constituintes.

B. Enquadramento da problemática e objetivos

1. Problemática

As plantas, ao longo da História da Humanidade, têm sido utilizadas como agentes terapêuticos, na medicina tradicional, para um largo espectro de doenças. Nos países subdesenvolvidos, as plantas constituem ainda a principal forma de resposta às necessidades dos primeiros cuidados de saúde. Nos últimos anos, a terapia nutricional e fitoterapia surgiu como um novo conceito para a melhoria da saúde humana, assim como prevenção e mesmo tratamento de diversas patologias. Na última década, diversos estudos salientaram o potencial quimiopreventivo de diversos fitoquímicos em determinadas patologias como doenças cardiovasculares, osteoporose, hipertensão, diabetes tipo 2, e diversos tipos de cancro, como o da pele, próstata, cólon, hepático e mama. A extracção e a identificação de compostos bioactivos de origem vegetal, onde os polifenóis desempenham a principal função, torna-se uma solução terapêutica muito promissora, uma vez que, em certas circunstâncias os compostos fitoquímicos possuem um efeito superior aos das terapias químicas convencionais, devido às suas propriedades antioxidantes e baixa toxicidade, e, sendo por este motivo muito bem tolerados.

Cynara cardunculus, geralmente designada por cardo, é uma das espécies do género *Cynara* mais abundantes em Portugal. Trata-se de uma planta herbácea, originária da região mediterrânea, que se desenvolve, espontaneamente, em terrenos não cultivados e áridos, com um elevado potencial biológico, baseado no seu perfil fitoquímico. A actividade anti-tumoral de extractos derivados de Cc é ainda bastante desconhecida, devido à quase inexistência de estudos moleculares, utilizando extractos totais da planta, em contexto tumoral.

Entre os cancros mais comuns, e malignos, encontram-se o carcinoma hepatocelular e o cancro da mama de fenótipo triplo negativo, sendo que o carcinoma hepatocelular é o quinto tumor mais frequente em todo o mundo, altamente resistente à quimioterapia convencional, com poucas opções terapêuticas, enquanto o cancro da mama é a principal causa de morte por cancro entre mulheres e, particularmente, o fenótipo triplo negativo é caracterizado por um historial clínico muito agressivo, e com poucas opções terapêuticas. O prognóstico desfavorável associado a estes dois tipos de carcinomas realça a importância do desenvolvimento de novas terapias, nomeadamente a utilização de compostos naturais com grande potencial biológico.

Entre os diversos mecanismos de sinalização envolvidos no processo de carcinogénese, a via do PI3K/AKT/mTOR destaca-se pela sua importância em vários

eventos celulares, nomeadamente a regulação do ciclo celular, indução de apoptose, diferenciação e proliferação. Assim, é premente identificar alvos terapêuticos que tenham em vista o sistema de sinalização PI3K/AKT/mTOR.

Nesta perspectiva, pretende-se efectuar a caracterização biológica de dois extractos de Cc: FCF e CCF, com ênfase para a actividade anti-proliferativa, estudando molecularmente o papel destes extractos na regulação da via de sinalização do PI3K/AKT/mTOR, usando modelos *in vitro* de carcinoma hepatocelular (HepG2) e cancro da mama de fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231).

2. Objectivos

Objectivo geral

- ✓ Caracterizar a actividade anti-proliferativa de extractos de *Cynara cardunculus* (folha e caule cultivados frescos), bem como o efeito destes extractos na regulação molecular da via de sinalização do PI3K/AKT/mTOR utilizando um modelo *in vitro* de carcinoma hepatocelular e cancro da mama de fenótipo triplo negativo.

Objectivos específicos

- ✓ Determinar o IC₅₀ para o extracto de FCF de Cc, em termos de resposta anti-proliferativa, em células de carcinoma hepatocelular - HepG2, e carcinoma da mama (fenótipo triplo negativo) - MDA-MB-231.
- ✓ Estudar o perfil de expressão das isoformas da subunidade p110 da classe I (p110 α , p110 β e p110 γ) do PI3K, na presença das concentrações de IC₅₀ para o efeito anti-proliferativo do extracto de FCF de Cc, em linhas tumorais (HepG2 e MDA-MB-231).
- ✓ Caracterizar os níveis de expressão proteica de AKT total na presença de extracto de FCF de Cc e de um inibidor comercial específico o LY294002.

C. Material e Métodos

1. Material

1.1. Extractos de caule cultivado fresco (CCF) e folha cultivada fresca (FCF) de *Cynara cardunculus* cultivada

Os caules e folhas de Cc cultivado fresco foram colhidos em Junho de 2008 no Campo Hortofrutícola da Escola Superior Agrária de Beja, Penedo Gordo, Beja. Os tecidos foram conservados a -80°C até à sua utilização. Para a preparação do extracto, os tecidos foram cortados em pequenos pedaços e deixados a hidratar *overnight*. Posteriormente adicionou-se metanol até ao volume de 60%. Os tecidos foram deixados em metanol durante 1h, sendo então homogeneizados por maceração e sonificados. Os extractos em 60% metanol foram então filtrados com papel de filtro, seguindo-se uma filtração por filtro de 0,2 µm. Os extractos obtidos foram completamente evaporados no rotavapor, dissolvidos em água e armazenados a -80°C, até subseqüente utilização. Para a determinação do peso seco foi deixado na estufa 100g de tecido fresco, a 70°C e o peso foi registado até à estabilização. Posteriormente os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método já estabelecido no Laboratório de Compostos Bioactivos do CEBAL, sendo que o extracto de CCF e FCF apresentaram, respectivamente, 0,66 e 9,25 mg equivalentes de ácido gálico/ml de peso seco.

1.2. Cultura de células animais: modelo *in vitro* para o carcinoma hepatocelular (HepG2) e para o cancro da mama fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231)

A linha celular de CHC, denominada HepG2, foi adquirida directamente à American Type Culture Collection (referência ATCC – HB-8065 *Homo sapiens*) e mantida em cultura, em frascos de poliestireno, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura é constituído por MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) suplementado com 10% de FBS (*fetal bovine serum*), 1% de solução antibiótica-antimicótica, 1 mM de piruvato de sódio e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio

A linha celular de cancro da mama fenótipo triplo negativo, denominada MDA-MB-231, foi adquirida directamente à American Type Culture Collection (referência

ATCC – HTB-26 *Homo sapiens*) e mantida em cultura em frascos de poliestireno, sob uma atmosfera de 5% CO₂ e 37°C. O meio de cultura é constituído por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado apenas com 10% de FBS e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

2. Métodos

2.1. Efeito anti-proliferativo de extractos de Cc (CCF e FCF) em células tumorais

Células HepG2 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 12 poços, numa concentração de 2×10^5 células/mL. Após 24h, o meio de cultura foi removido, de seguida a monocamada de células foi lavada com PBS 1x (*phosphate buffer saline*), e de seguida o novo meio de cultura foi adicionado, já suplementado com diferentes concentrações dos dois extractos em estudo. Às células controlo adicionou-se PBS, em volume igual ao máximo de extracto adicionado. Após as 48h, o meio de cultura foi desprezado, e as células foram tripsinizadas. A viabilidade celular foi determinada por adição de azul de tripano, seguida da contagem directa das células utilizando a câmara de Neubauer (Anexo I, iii.). O azul de tripano é um corante orgânico de amina, incapaz de penetrar células intactas, mas totalmente incorporado em células com membrana danificada.

2.2.1. Determinação do IC₅₀ para extractos de CCF e FCF de Cc em células HepG2 e MDA-MB-231

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 12 poços, numa concentração de 2×10^5 células/mL. Após 24h, o meio foi mudado e suplementado, por 48h, com as seguintes concentrações de extracto de CCF e FCF: 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 20; 25 e 28,8 µg/mL de compostos fenólicos e 0,46; 0,92; 1,84; 2,76; 3,68 e 4,6 µg/mL de compostos fenólicos, respectivamente. Para as células MDA-MB-231 procedeu-se de igual modo, utilizando as concentrações 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 e 2,5 µg/mL de

compostos fenólicos de extracto de FCF. Para a determinação do efeito de cada uma das concentrações testadas, em termos de efeito proliferativo, nas duas linhas celulares HepG2 e MDA-MB-231, foram realizados triplicados para cada uma das concentrações testadas.

A determinação dos valores de IC₅₀ foi realizada pelo programa *Origin®*, *Origin Lab Corporation*.

2.2. Expressão génica das isoformas do PI3K em células tumorais incubadas com extracto da FCF de Cc

Células HepG2 e MDA-MB-231 foram plaqueadas, numa concentração de 5×10^5 células/mL. Após 24h de cultura, a monocamada de células foi lavada gentilmente, com PBS. O meio adicionado foi suplementado com a concentração correspondente ao IC₅₀ para o extracto da FCF de cada uma das linhas celulares. Como controlo para a inibição da via do PI3K foi utilizado o inibidor comercial LY294002 (Sigma) na concentração de 25µM, dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma). As células controlo, de cada uma das experiências, foram tratadas de igual modo, mas em vez de serem suplementadas com extracto, foram incubadas com DMSO, solvente em que o inibidor LY294002 foi dissolvido. Adicionalmente, para cada uma das experiências, células HepG2 ou MDA-MB-231 não tratadas (apenas incubadas com meio de cultura) serviram como controlo interno. Após as 48h de incubação com os extractos, as células foram recolhidas segundo o protocolo em anexo (Anexo I; iv.) e as respectivas *pellets* celulares guardadas a -80°C, até extracção do ácido ribonucleico (ARN).

2.2.1. Extracção de ARN

A extracção de ARN foi realizada seguindo as instruções do kit *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) (Anexo I, v.). As amostras biológicas foram primeiro lisadas e homogeneizadas na presença de tampão desnaturante de guanidina-tiocianato, que inactiva imediatamente ARNses, garantindo a integridade e purificação do ARN. A

remoção de contaminantes foi realizada pela passagem do material biológico por colunas, com membranas à base de sílica, onde o ARN total se liga à membrana, enquanto os contaminantes são removidos eficientemente. O ARN foi, posteriormente eluído da membrana de sílica em 30-100 μL de água, e guardado a -80°C até futura utilização. A extracção de ARN foi realizada em triplicado para cada uma das condições testadas, nas duas linhas celulares HepG2 e MDA-MB-231.

A integridade do ARN purificado foi analisada por visualização em gel de agarose como descrito em anexo (Anexo I, vi.). De seguida procedeu-se à determinação da concentração efectiva do ARN, determinada por medição da absorvância a 260nm, como referido em anexo (Anexo I, vii.). Considera-se que uma unidade de absorvância corresponde a 44 μg de ARN por mL, a referida quantificação, para além da determinação do valor exacto da concentração, indica também, através de rácios de absorvâncias a 260/280nm a presença de contaminações por ADN e/ou proteínas, indicando, também a integridade do ARN extraído.

2.2.2. Síntese de cADN

A síntese de cADN foi realizada com o kit *QuantiTect® Reverse Transcription* (Quiagen). A amostra de ARN (1 μg) foi inicialmente incubada durante 2min. a 42°C para eliminação de ADN genómico, sendo esta amostra directamente utilizada na transcrição reversa. Posteriormente, foi adicionada o enzima transcriptase reversa, bem como o tampão do enzima, tendo a reacção lugar a 42°C (Anexo I, viii.).

2.2.3. PCR para as isoformas do p110 (α , β , γ) da classe I do PI3K

Para a análise da expressão das isoformas da subunidade p110 do PI3K pela técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizadas sequências de *primers* específicos, tal como descrito na Tabela 1, utilizando como *template* o cADN previamente sintetizado. Como gene de referência foi utilizada a β -actina, com primers específicos desenhados, pela equipa de investigação do Laboratório dos Compostos Bioactivos do CEBAL, utilizando o programa “*Primer designing tool*” em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, tendo como referência a sequência de ARNm da β -actina (*Homo sapiens* actin, beta, mRNA, número de entrada NM 001101.3).

Tabela 1: Sequência de oligonucleótidos para as várias isoformas da subunidade catalítica p110 da Classe I do PI3K.

Identificação do gene	Sequência do primer	Tamanho dos segmentos amplificados (pb)
p110-α	F: 5'-CTGTGTGGGACTTATTGAGGTGGTGC-3' R: 5'-GGCATGCTGTCGAATAGCTAGATAAGC-3'	452
p110-β	F: 5'-GAAGATTGCAAGCAGTGATAGTGC-3' R: 5'-CCTATCCTCCGATTACCAAGTCGTC-3'	432
p110-γ	F: 5'-GCTTGAAAACCTGCAGAATTCTCAAC-3' R: 5'-CGTCTTTCACAATCTCGATCATTCC-3'	346

A reacção de amplificação das isoformas e da β -actina foi realizada do seguinte modo: 100 ng de cADN; 1x PCR *buffer* (*Dream Taq buffer*, Fermentas); 200 μ M de cada dNTP (Fermentas); 1,25 μ M de cada *primer* (Thermo Scientific); 1U Taq ADN polimerase (Fermentas) e água MiliQ ultra pura, num volume final de 25 μ L/amostra. As condições de amplificação, para cada par de sequências de primers encontram-se, resumidamente, descritas na Tabela 4 (Anexo I, ix.). As reacções de PCR foram realizadas no termociclador “MyCicle” da Biorad.

Os produtos de amplificação foram separados em electroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados com o transiluminador, de luz ultravioleta (GelDoc, Biorad). A avaliação do peso molecular, de cada um dos fragmentos, realizou-se por comparação com padrões comerciais de pesos moleculares, aplicados paralelamente com as amostras.

2.3. Análise da expressão proteica de AKT em células de cancro da mama tratadas com extracto de FCF de Cc

2.3.1. Preparação dos lisados proteicos

Células MDA-MB-231 foram plaqueadas, numa concentração de 5×10^5 células/mL. Após 24h de cultura, a monocamada de células foi gentilmente lavada com PBS. O meio adicionado foi suplementado com a concentração correspondente ao IC_{50} para o extracto da FCF em MDA-MB-231 bem como o inibidor LY294002 na concentração de $25 \mu\text{M}$. Nas células controlo foi adicionado solvente DMSO, ou apenas meio de cultura, servindo como controlo interno. Depois das 48h, as células foram recolhidas e os lisados proteicos obtidos segundo o protocolo em anexo (Anexo I, x.), e posteriormente guardados a -80°C . A obtenção de lisados proteicos, para cada uma das condições testadas, em células MDA-MB-231 foi realizada em triplicado.

2.3.2. Quantificação total de proteínas

A determinação da concentração em proteína total foi efectuada segundo o método de Lowry (Anexo I, xi.). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, reagente Folin-Ciocalteu, que na presença de proteínas sofre uma redução, na presença do catalisador Cobre II, produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm.

2.3.3. Western-blott para a proteína AKT

A quantidade de proteína utilizada foi de $50 \mu\text{g}$. A separação de proteínas foi efectuada por electroforese em SDS-PAGE em Gel de acrilamida 15% (Anexo I, xii.). Como marcador de pesos moleculares proteicos utilizou-se o *EZ-RunTM Rec Protein Ladder* (Fisher BioReagents). Após a separação das proteínas, foi efectuada a

transferência húmida (*Tank Blotting* - Hoefer®) para a membrana de difluoreto de polivinilideno, vulgarmente designada de PVDF. Após o bloqueio das membranas, as membranas ficaram durante a noite, a incubar com o anticorpo primário (policlonal AKT1, diluição 1:200 (C-20:SC-1618 Santa Cruz Biotechnology Inc.) ou o anticorpo policlonal da β -actina, diluição 1:300, (I-19:SC1616 Santa Cruz Biotechnology Inc.). Como anticorpo secundário foi utilizado o *donkey anti-goat* conjugado com a peroxidase *horseradish* (HRP) (Santa Cruz Biotechnology). A detecção foi feita por quimioluminescência, utilizando o reagente de detecção *ECL Plus* (GE Healthcare).

2.4. Análise estatística

Para o tratamento dos dados relativos às curvas de proliferação celular das células HepG2 e MDA-MB-231, testando as várias concentrações de extractos de Cc, bem como a análise da expressão génica das isoformas do p110 aplicou-se uma análise de variância para um factor (ANOVA *one-way*). Este é um teste paramétrico utilizado para avaliar as diferenças de médias entre os grupos (variância entre situações) e dentro dos grupos (variância de erros), admitindo que as variáveis possuem homogeneidade de variância e normalidade. O cálculo do teste de Levene da homogeneidade de variâncias serve para aferir a não violação de um dos pressupostos da ANOVA.

O nível de confiança utilizado para o teste ANOVA, com um factor, foi de 95%. Os valores cuja probabilidade de ocorrência foi superior a 95% ($p < 0,05$) foram considerados significativamente diferentes; por outro lado, considerou-se que não existem diferenças significativas naqueles em que a probabilidade de ocorrência foi inferior a 95% ($p > 0,05$). O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi o teste de Tukey.

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS (versão 16.0), *Copyright ©, Microsoft corporation.*

D. Resultados e Discussão

Um vasto número de compostos derivados do metabolismo secundário de plantas, tem vindo a ser utilizado no tratamento e/ou prevenção de diferentes tipos de cancro (Conforti *et al.*, 2008). Entre o período de 1990 a 2000, ocorreram mais de 6 milhões de óbitos por cancro em todo o mundo (Conforti *et al.* 2008). O desenvolvimento de novas terapias, baseadas na utilização de compostos derivados de plantas, tem apresentado uma crescente utilização, no que diz respeito ao tratamento oncológico (Miadokova *et al.*, 2008; Ramos, 2008). A identificação de novos compostos, e consequente investigação com vista à determinação do seu potencial biológico, especialmente a nível da quimioprevenção é premente para o tratamento de cancros que apresentem actualmente terapias muito insatisfatórias (Birt *et al.*, 2001), como é o caso do carcinoma hepatocelular e do cancro da mama de fenótipo triplo negativo.

Cynara cardunculus, devido ao seu perfil fitoquímico, apresenta um elevado potencial biológico (Petrovic *et al.* 2008), sendo a actividade anti-carcinogénica de extractos naturais derivados, e/ou compostos derivados desta planta, ainda pouco estudada, especialmente no contexto dos tumores anteriormente referidos (CHC e cancro da mama fenótipo triplo negativo).

O presente trabalho teve como objectivo principal a determinação do potencial anti-proliferativo de dois extractos derivados de plantas frescas de Cc, variedade cultivada, FCF e CCF, em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e de cancro da mama de fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231). A inexistência de estudos moleculares, com extractos totais de Cc despoletou o interesse no estudo da via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR. Esta via regula funções celulares fundamentais como a transcrição, a tradução, a sobrevivência, e a proliferação (Osaki *et al.*, 2004). De forma a determinar de que forma o extracto de FCF e CCF actua nesta via molecular, analisaram-se os níveis de expressão das isoformas da subunidade p110 do PI3K. Por último, sendo a cinase de serina/treonina (AKT), uma das mais importantes e versáteis cinases no centro da fisiologia e patologia humana, os níveis de expressão proteica de AKT foram avaliados na presença do extracto de FCF, utilizando como controlo um reconhecido inibidor específico da via, o LY294002, em células de cancro da mama de fenótipo triplo negativo.

1. Efeito anti-proliferativo de extractos de Cc (CCF e FCF) em células tumorais

Na determinação do efeito anti-proliferativo de extractos (FCF e CCF) de Cc, as células foram incubadas durante 48h com concentrações crescentes de extracto. Posteriormente, a viabilidade celular foi determinada através do método de azul de tripano, cada uma das concentrações de extracto foi testada, pelo menos, em três ensaios independentes.

O efeito do extracto de FCF de Cc na proliferação celular foi avaliado na linha celular de CHC: HepG2. As células foram incubadas durante 48h com diferentes concentrações do extracto (0,46-4,6 $\mu\text{g/mL}$, concentrações expressas em termos de equivalentes de ácido gálico (mg)/g de peso seco, ou seja, valores relativos a compostos fenólicos totais). Os resultados mostram claramente o efeito inibitório que concentrações crescentes de extracto de FCF têm na proliferação das células HepG2 (Figura 15). A análise estatística, utilizando a comparação múltipla de médias, pelo teste de Tukey, mostra variações significativas ($p < 0,05$) para algumas das concentrações testadas, nomeadamente, células incubadas com concentrações mais baixas (0,46 e 0,92 $\mu\text{g/mL}$ compostos fenólicos totais) apresentam já diferenças significativas quando comparadas com células controlo. Este resultado parece estar de acordo com o obtido por Miccadei e colaboradores, demonstrando que células HepG2 tratadas com extracto metanólico total de *Cynara scolymus* L. apresentaram uma redução de viabilidade num efeito dose-resposta, com concentrações de 400-1200 μM em termos de equivalentes de ácido clorogénico, ou seja de compostos fenólicos totais (Miccadei et al. 2008).

Com base na curva de crescimento celular, foi possível determinar o valor de IC_{50} para o extracto de FCF, em células HepG2, que foi de 1,74 $\mu\text{g/mL}$ expresso em termos de concentração de compostos fenólicos totais (Figura 16). Este valor foi posteriormente utilizado para a determinação da expressão das isoformas da subunidade p110 da classe I do PI3K.

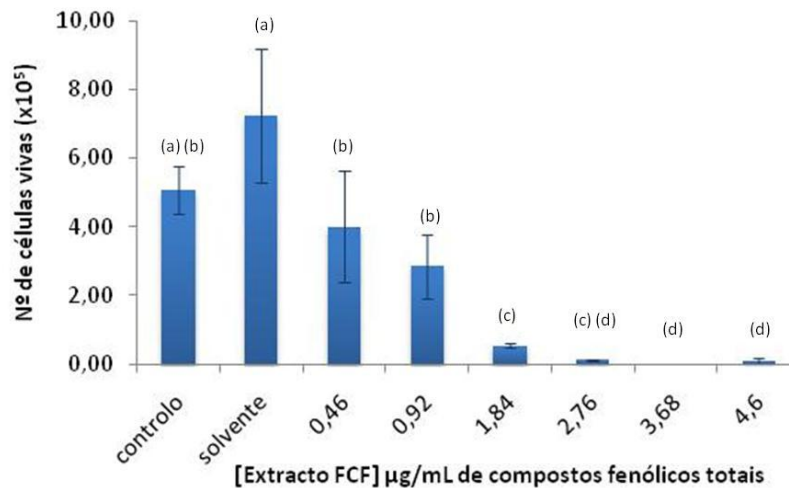


Figura 15: Representação gráfica do efeito da concentração de extracto de Folha Cultivada Fresca de *Cynara cardunculus* no crescimento celular de células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2). As células foram incubadas durante 48h, com concentrações crescentes de extracto (0,46 – 4,6 µg/mL de compostos fenólicos totais). Como controlo foram utilizadas células HepG2 sem tratamento e células HepG2 com solvente (PBS) utilizado na diluição dos extractos de FCF.

Os valores representam a média \pm erro padrão, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas. Grupos sem letras em comum são significativamente diferentes, $P < 0,05$.

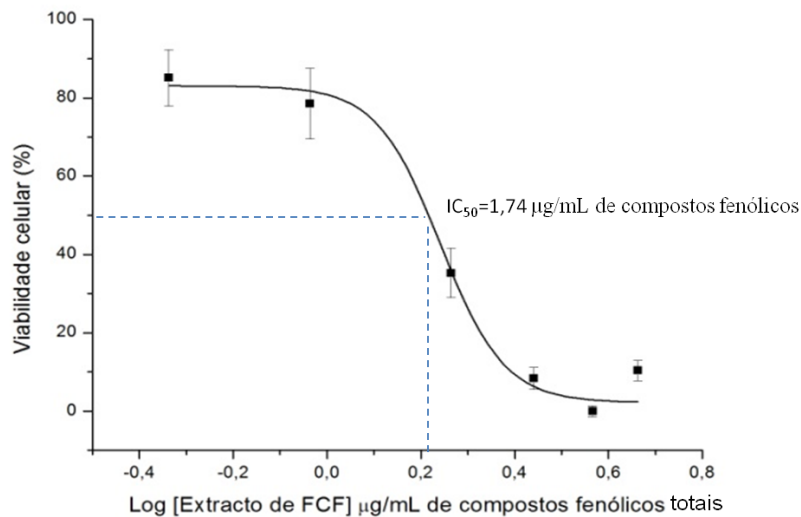


Figura 16: Representação gráfica da determinação do valor de IC_{50} relativos à viabilidade celular, em termos de crescimento, das HepG2 quando incubadas, durante 48h, com concentrações crescentes de extracto de FCF de Cc. A análise dos dados foi efectuada utilizando o programa Origin 6.1. Os valores representam a média \pm erro padrão, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas.

O extracto de CCF foi igualmente testado em células HepG2, com vista a determinar o seu potencial efeito no crescimento desta linha celular. As células foram incubadas durante 48h com diferentes concentrações de extracto (0,1-28,8 µg/mL concentrações expressas em termos de equivalentes de ácido gálico (mg)/g de peso seco, ou seja, valores relativos a compostos fenólicos totais). Na concentração de 0,1 µg/mL, o extracto não afectou significativamente a viabilidade celular, mas a partir desta concentração observou-se uma inibição do crescimento celular até à concentração de 2 µg/mL de compostos fenólicos totais. A partir deste valor, de acordo com os resultados apresentados (Figura 17), o número de células viáveis deixa de diminuir, observando-se inclusive um aumento do número de células vivas na concentração de 3 µg/mL. No entanto, com o aumento da concentração de extracto, até à concentração de 7 µg/mL, não se verifica qualquer efeito em termos de viabilidade celular, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o número de células tratadas com extracto de CCF contendo 3, 4, 5, ou 7 µg/mL de compostos fenólicos totais. De seguida, e num perfil de efeito “tipo onda”, concentrações de 10 µg/mL de CCF apresentam um efeito muito acentuado na proliferação das células HepG2, com diferenças muito acentuadas quando comparado quer com as células controlo, quer com as células tratadas com a gama de concentrações de 3-7 µg/mL de compostos fenólicos presentes em extractos metalónicos de CCF de Cc. Com base em resultados anteriores do grupo de investigação do Laboratório de Compostos Bioactivos, do CEBAL, o extracto de CCF apresenta-se como o mais potente, em termos de potencial anti-oxidante, apesar de ser um dos extractos com menor concentração de compostos fenólicos totais, tal como descrito na Figura 5 da Introdução desta tese.

O resultado obtido com o extracto CCF, em termos de viabilidade celular das células HepG2, revela claramente, a importância, não só da quantificação mas também da identificação química dos principais compostos fenólicos presentes. A concentração total de flavonóides neste extracto, relativamente à de fenóis totais é bastante elevada, o que pode promover certas actividades biológicas em detrimento de outras, mais evidentes no extracto da FCF. Assim, não é de estranhar, que na determinação do efeito anti-proliferativo deste extracto em células HepG2, o extracto de CCF apresente um duplo efeito, com diminuição do número de células viáveis, em certas gamas de concentrações, e o aumento da viabilidade celular para uma gama intermédia (3-7 µg/mL de compostos fenólicos totais). Os compostos presentes no extracto de CCF

podem actuar de modo sinérgico aumentando o efeito anti-proliferativo do extracto até determinadas concentrações, mas quando a razão entre os compostos se altera para concentrações mais elevadas, este feito sinérgico parece diminuir. Neste caso seria necessário recorrer a outras técnicas de análise, nomeadamente HPLC-MS para a identificação dos principais polifenóis presentes no extracto, e posteriormente verificar quais os responsáveis por este efeito duplo em linhas celulares. A tarefa de caracterização química do extracto de CCF, bem como FCF encontra-se já em curso, no âmbito de uma tese de doutoramento em parceria com o CICECO, da Universidade de Aveiro

O valor de IC_{50} não foi calculado para o extracto do CCF, uma vez que o mesmo não apresentava um perfil de inibição de proliferação das células HepG2, de efeito dose-resposta linear. O resultado obtido para o extracto de CCF, em termos de efeito na proliferação das células HepG2, revelou que o estudo deste extracto é por si não só muito complexo, como também a informação que dispomos no presente, é uma limitação para a compreensão total dos resultados obtidos. Deste modo, foi decidido que no âmbito dos trabalhos desenvolvidos para a presente tese de mestrado, este extracto não seria testado na linha celular de carcinoma da mama, com fenótipo triplo negativo.

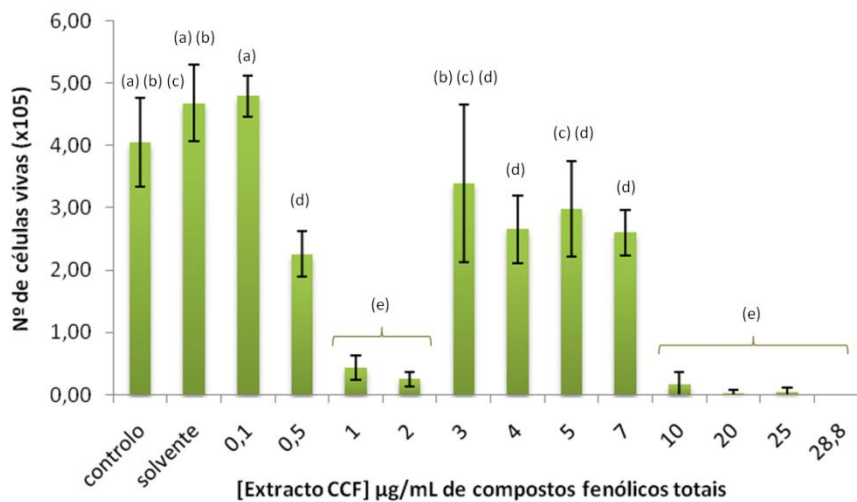


Figura 17: Representação gráfica do efeito da concentração de extracto de Caule Cultivado Fresco de *Cynara cardunculus* no crescimento celular de células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2). As células foram incubadas durante 48h, com concentrações crescentes de extracto (0,1 – 28,8 µg/mL de compostos fenólicos totais). Como controlo foram utilizadas células HepG2 sem tratamento e células HepG2 com solvente (PBS) utilizado na diluição dos extractos. Os valores representam a média ± erro padrão, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas. Grupos sem letras em comum são significativamente diferentes, $P < 0,05$.

Analogamente, determinou-se o efeito do extracto de FCF de Cc na proliferação celular para a linha de cancro da mama, fenótipo triplo negativo: MDA-MB-231 (Figura 18). As células foram incubadas durante 48h com diferentes concentrações do extracto (0,1-2,5 µg/mL, concentrações expressas em termos de equivalentes de ácido gálico (mg)/g de peso seco, ou seja, valores relativos a compostos fenólicos totais)). Células MDA-MB-231 quando tratadas com concentrações crescentes de extracto de FCF mostram, de modo semelhante ao que se verificou para as células HepG2, uma diminuição no número de células viáveis. A análise estatística mostra variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para algumas das concentrações testadas, utilizando a comparação múltipla de médias, pelo teste de Tukey. O valor do IC₅₀ calculado com base nestes resultados é de 0,74 µg/mL de compostos fenólicos totais (Figura 19). Adam e colaboradores anteriormente já haviam demonstrado que células MDA-MB-231 incubadas com extracto metanólico total de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*), rico em diversos polifenóis, apresentavam inibição da proliferação celular (Adams et al. 2010). O efeito sinérgico apresentado pelos compostos presentes no extracto revela-se na pronunciada actividade anti-proliferativa que o extracto de FCF apresenta na linha celular MDA-MB-231.

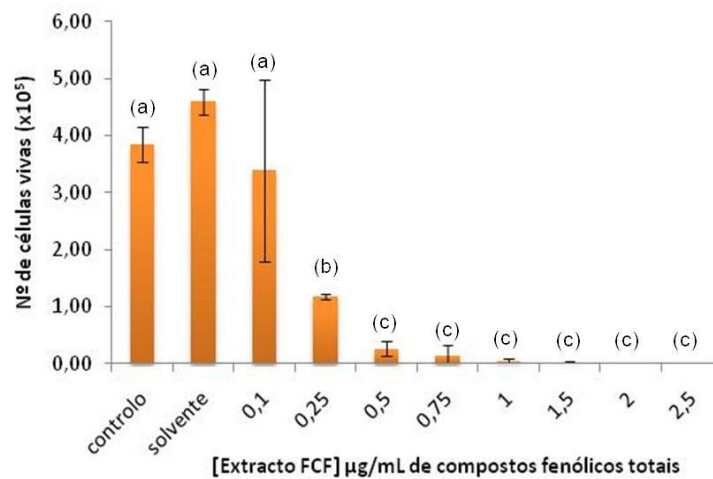


Figura 18: Representação gráfica do efeito da concentração de extracto de Folha Cultivada Fresca de *Cynara cardunculus* no crescimento celular de células MDA-MB-231. As células foram incubadas durante 48h, com concentrações crescentes de extracto (0,1 – 2,5 µg/mL de compostos fenólicos totais). Como controlo foram utilizadas células MDA-MB-231 sem tratamento e células MDA-MB-231 com solvente (PBS) utilizado na diluição dos extractos. Os valores representam a média ± erro padrão, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas. Grupos sem letras em comum são significativamente diferentes, $P < 0,05$.

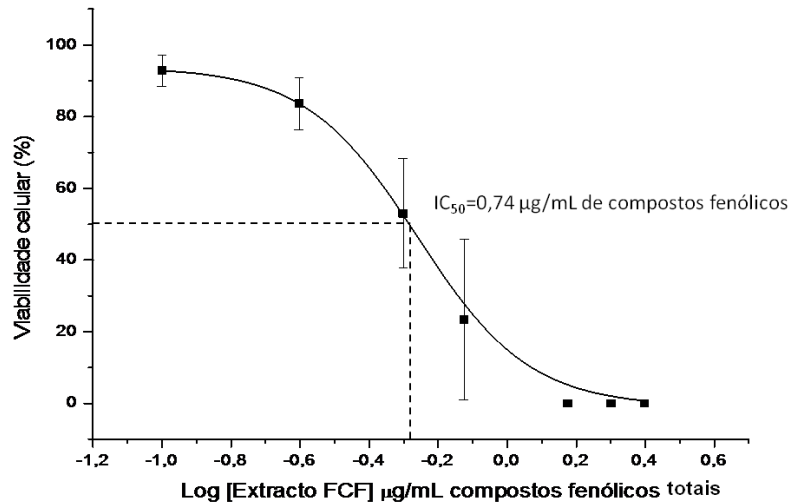


Figura 19: Representação gráfica da determinação dos valores de IC_{50} relativos à viabilidade celular, em termos de crescimento, das células MDA-MB-231 incubadas, durante 48h, com diferentes concentrações de extracto de FCF de Cc. A análise estatística dos dados foi efectuada utilizando o programa Origin 6.1. Os valores representam a média \pm erro padrão, obtidos pelos triplicados efectuados, independentemente, para cada uma das concentrações testadas.

Com base nos resultados anteriormente apresentados, os quais sugerem uma actividade anti-proliferativa, em contexto tumoral, para o extracto de FCF, quer em células de carcinoma hepatocelular (HepG2), quer em células de cancro da mama de fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231), de seguida pretendeu-se averiguar, o potencial efeito que este extracto desempenha na regulação molecular desta resposta

2. Efeito do extracto de FCF de Cc na expressão génica das isoformas do PI3K em células tumorais

A análise do efeito dos extracto de FCF na via do PI3K foi inicialmente realizada por análise da expressão das isoformas (α , β , γ) da subunidade p110 da classe I (IA e IB) do PI3K. Para tal, as células HepG2 e MDA-MB-231 foram incubadas, durante 48h, com as concentrações correspondentes aos valores IC_{50} , 1,74 e 0,74 $\mu\text{g/mL}$, determinados em termos de viabilidade celular, para cada uma das linhas celulares, HepG2 e MDA-MB-231, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, no ensaio com células de hepatocarcinoma humano parece haver uma diminuição da expressão da isoforma γ do gene *PI3K p110* (classe IB) (Figura 20).

Relativamente às outras isoformas parece não existir qualquer alteração de expressão com a adição de extracto de FCF, quando comparado com as células controlo (Figura 20). De acordo com a análise densiométrica das razões entre a expressão do gene alvo (*PI3K p110 α , β e γ*) e o gene referência (*β -actina*) não se verifica qualquer diferença entre a expressão das isoformas α , β (Figura 21). A expressão da isoforma γ é efectivamente mais baixa, quando comparada com as restantes, em células não tratadas, sendo que na presença do extracto de FCF parece que a expressão da isoforma γ diminui ainda mais acentuadamente (Figura 21). Não foi possível efectuar o tratamento estatístico destes dados, já que apenas foi realizado um ensaio (n=1). A cultura de células HepG2, no decorrer dos trabalhos conducentes a esta tese, apresentou vários problemas de crescimento e viabilidade. Após várias optimizações, no método de cultura, e não havendo um número de células suficiente para novos ensaios, foi assim impossibilitada a realização destes para a linha celular de carcinoma hepatocelular. Pelo que os restantes resultados focar-se-ão apenas nas células de carcinoma da mama, com fenótipo triplo negativo (MDA-MB-231).

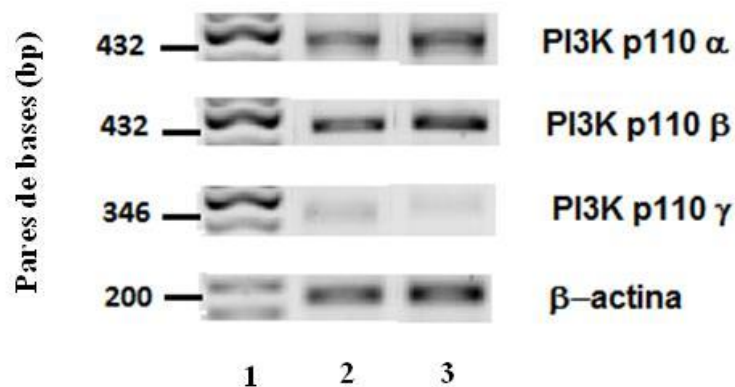


Figura 20: Visualização dos produtos de PCR, resultantes da análise, por RT-PCR dos níveis de expressão das isoformas da subunidade p110 classe I do PI3K, em células humanas de carcinoma hepatocelular, incubadas durante 48h na presença de concentrações correspondentes ao IC_{50} para o extracto de FCF. Como gene de referência foi utilizado a β -actina. Legenda: 1- Marcador de peso molecular; 2- Controlo – células HepG2 sem adição do extracto; 3- Células HepG2 tratadas com 1,74 μ g/ml de compostos fenólicos totais do extracto de FCF.

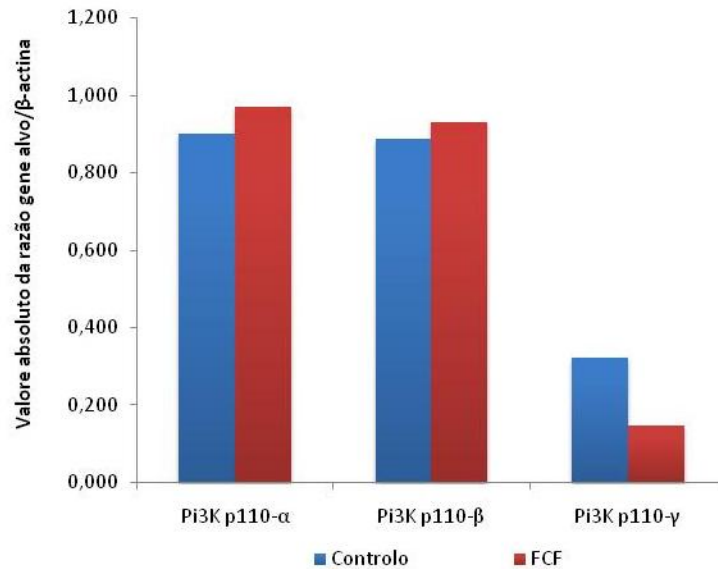


Figura 21: Análise densiométrica para determinação das razões de expressão entre as isoformas α , β , γ da subunidade p110 da classe I do PI3K, e o gene de referência β -actina em células HepG2. Análise densiométrica das bandas em gel (n=1) de agarose 1,5% utilizando o programa *QuantityOne* da BioRad.

Apesar da evidente implicação do PI3K no cancro, o envolvimento de cada uma das isoformas (α , β , γ) no desenvolvimento do cancro da mama não é ainda completamente conhecida (Carvalho *et al.*, 2010). Até recentemente, o principal foco de investigação, nesta área, era o estudo da subunidade p110 α , pois a presença de mutações no gene *PIK3CA* está associada com a sobre-expressão de p110 α (Carvalho *et al.*, 2010). A subunidade p110 β tem vindo a ganhar importância neste contexto, tendo sido demonstrado que ratos que expressam uma forma catalítica inactiva de p110 β estão mais protegidos, contra o desenvolvimento de tumores (Ciraolo *et al.*, 2008). Estes dados salientam assim, a importância do estudo da expressão das isoformas do p110 da classe I do PI3K, com extracto de FCF de Cc em células de cancro da mama de fenótipo triplo negativo. A utilização de um inibidor comercial da via do PI3K, o LY294002, permitiu identificar diferentes níveis de expressão das várias isoformas, servindo como controlo interno para as células tratadas com o extracto FCF (concentrações correspondentes aos valores IC₅₀ (0,74 μ g/mL) determinados em termos de viabilidade celular)

Células MDA-MB-231 incubadas, durante 48h, com extracto de FCF (0,74 μ g/mL), e o inibidor LY294002 (25 μ M) não apresentaram diferenças significativas, em termos de expressão das três isoformas testadas (α , β , γ) da subunidade p110 da classe I do PI3K, em comparação com células não tratadas (Figura 22 e 23). Estudos anteriores,

em linhas celulares cancerígenas derivadas de músculo, mostram que as subunidades α e β da classe I do PI3K são inibidas *in vitro* pelo polifenol resveratrol (Fröjdö *et al.*, 2007).

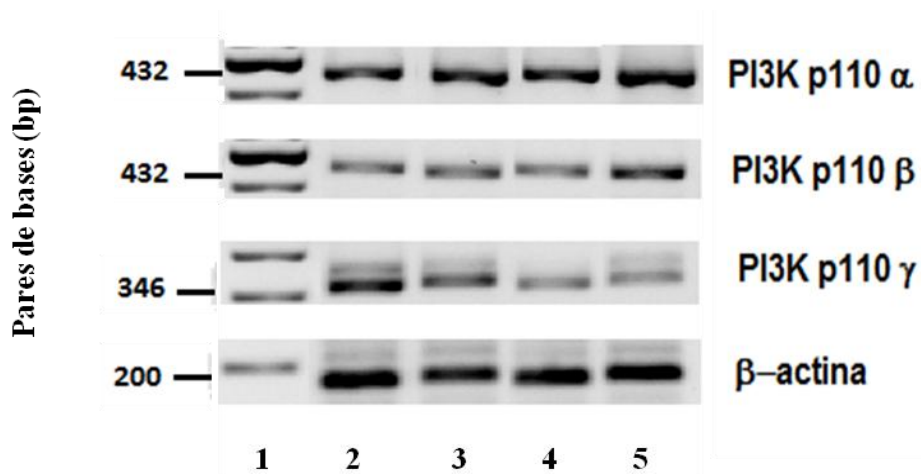


Figura 22: Visualização dos produtos de PCR, resultantes da análise, por RT-PCR dos níveis de expressão das isoformas da subunidade p110 classe I do PI3K, em células humanas de cancro da mama, fenótipo triplo negativo, incubadas durante 48h na presença de concentrações correspondentes ao IC_{50} , para o extracto de FCF para estas células. Como controlo interno foi utilizado um inibidor comercial da via do PI3K, o LY294002. Como gene de referência foi utilizado a β -actina. - Legenda: 1- Marcador de peso molecular; 2- Controlo – células MDA-MB-231 sem adição de extracto, apenas incubadas com o respectivo meio de cultura; 3- Células MDA-MB-231 tratadas com 0,74 μ g/mL compostos fenólicos totais do extracto de FCF; 4 – Células tratadas com o solvente no qual foi dissolvido o inibidor LY294002 (DMSO); 5- Células tratadas com LY294002 (25 μ M).

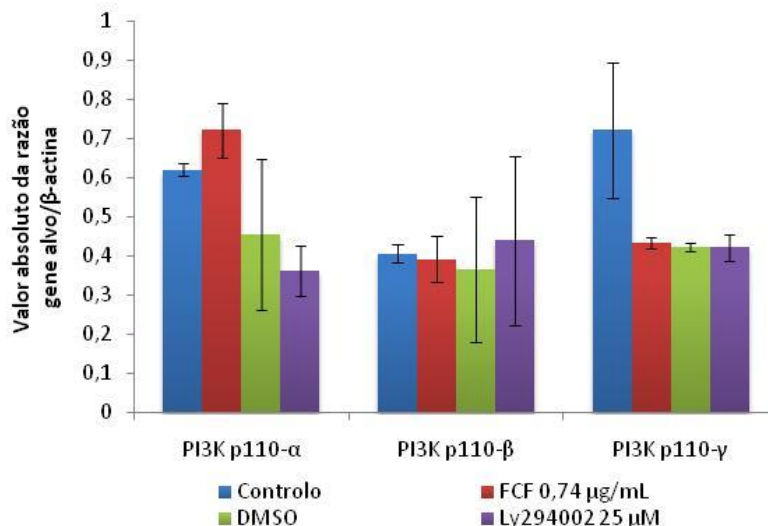


Figura 23: Análise densiométrica para a determinação das razões de expressão entre as isoformas α , β , γ da subunidade p110 da classe I do PI3K, e o gene de referência β -actina, em células MDA-MB-231. Análise densiométrica das bandas em gel ($n=3$) de agarose 1,5% utilizando o programa *QuantityOne* da BioRad. Os valores representam a média \pm erro padrão.

Estes resultados parecem indicar que a eventual regulação molecular induzida pelo extracto FCF de Cc, na via do PI3K, não se fará a nível da expressão das isoformas da subunidade catalítica, p110 da classe I do PI3K. Esta cinase encontra-se muito no início da via, sendo directamente activada pelos receptores, quer RTKs quer GPCR, o que poderá explicar a ausência de alteração na expressão das isoformas da sua subunidade catalítica. No sentido de explorar adicionalmente o eventual papel que o extracto de FCF poderá ter directamente na regulação da expressão da subunidade catalítica, seria interessante utilizar, individualmente, células *knock out* para receptores RTKs e GPCRs, e posteriormente avaliar o efeito do extracto na expressão da subunidade correspondente.

O AKT apresenta-se como alvo bastante interessante, uma vez que se encontra já mais abaixo na via de sinalização do PI3K, podendo não só ser activada e/ou inibida por outras moléculas, como também ser regulada directamente pelos seus próprios níveis de fosforilação, face a diferentes estímulos e contextos celulares.

3. Análise da expressão proteica de AKT em células de cancro da mama tratadas com extracto de FCF de Cc

A análise da expressão proteica do AKT foi realizada pela técnica de *Western blotting*. Células MDA-MB-231 foram incubadas durante 48h, com concentrações correspondentes aos valores IC_{50} (0,74 $\mu\text{g/mL}$) determinados em termos de viabilidade celular. Células controlo foram também incubadas na presença de um inibidor comercial da via do PI3K, o LY294002 (25 μM).

Com base nos resultados obtidos, a presença do extracto FCF promove uma diminuição na expressão proteica de AKT total, quando comparado com células não tratadas. Adicionalmente, a presença do inibidor comercial parece ser menos efectiva do que o extracto de FCF, ou seja, células tratadas com o LY294002 não apresentam uma redução, tão significativa, na expressão proteica da AKT total, quando comparada com o extracto de FCF (Figura 24). A concentração em que o inibidor foi utilizado (25 μM) pode explicar o facto de não apresentar diferenças de expressão proteica de AKT total em relação ao controlo, pois, como referido anteriormente, o LY294002 é um inibidor competitivo numa gama de concentrações baixa. De futuro será necessário restabelecer a concentração de LY294002 a utilizar de modo a obter, uma resposta mais efectiva.

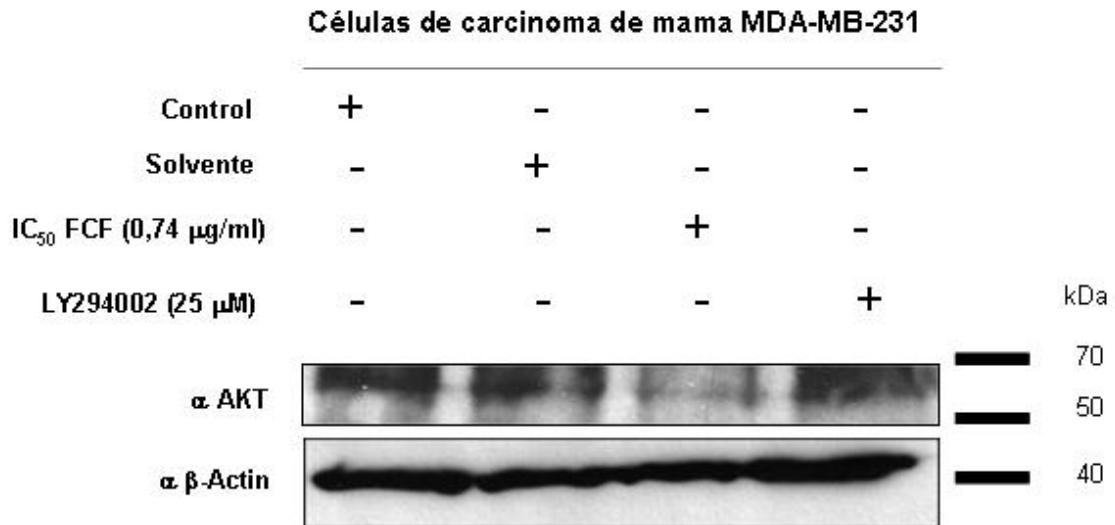


Figura 24: Imagem representativa da imunodeteção da proteína AKT1 por *western blot* em células humanas de cancro da mama, fenótipo triplo negativo. As células foram incubadas durante 48h na presença de concentrações correspondentes ao IC₅₀, para o extracto de FCF para estas células. Como controlo interno foi utilizado um inibidor comercial da via do PI3K, o LY294002. Como solvente utilizou-se DMSO, uma vez que foi o solvente em que se dissolveu o inibidor comercial. Como proteína de referência foi utilizada a β-actina.

Estudos anteriores mostram que em células de cancro da próstata, EGCG, e flavinas provenientes do chá preto inibem a via do PI3K diminuindo o nível de fosforilação de AKT (Siddiqui *et al.*, 2004). Em células de carcinoma mamário, o EGCG inibe a fosforilação do receptor basal de tirosina HER2, levando a uma subsequente inibição da activação do AKT (Garg *et al.*, 2005). A curcumina, um polifenol natural extraído da planta *Curcuma longa*, em concentrações fisiológicas inibe a fosforilação de AKT (Beevers *et al.* 2006). Pozo-Guisado e colaboradores demonstraram ainda que altas concentrações de resveratrol inibem a fosforilação de AKT em linhas de células de cancro da mama (Pozo-Guisado *et al.*, 2004).

Neste trabalho determinou-se o nível de AKT total que se refere ao AKT activado ou fosforilado (p-AKT) e ao AKT não activado. A diminuição do AKT total refere-se também assim a uma diminuição de p-AKT, porém seria interessante futuramente determinar o nível de expressão proteica de AKT fosforilado em células incubadas com extracto de FCF, de forma a determinar o nível de inactivação de AKT.

Os resultados deste trabalho mostram que o extracto de FCF de Cc apresenta um efeito anti-proliferativo em células de carcinoma hepatocelular e de cancro da mama de fenótipo triplo negativo. O extracto de CCF apresenta um efeito duplo, “tipo onda” em células HepG2, sendo necessário a determinação da composição química deste extracto, de forma a melhor compreender o potencial efeito sinérgico.

O extracto de FCF não altera os níveis de expressão das isoformas (α , β , γ) da classe I (IA e IB) do PI3K, na linha celular MDA-MB-231, mas altera significativamente o nível de expressão proteica de AKT total, mesmo em comparação com um inibidor comercial específico (LY294002). Estes resultados evidenciam um potencial para o extracto de FCF de Cc na regulação da via do PI3K/AKT/mTOR, abrindo as portas para novas investigações focando o efeito de extractos de Cc em outros substratos vitais para o funcionamento da via, e conseqüente efeito na resposta anti-tumoral.

E. Conclusões e perspectivas futuras

O desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de carcinomas refractários à quimioterapia tradicional, como é o caso do CHC e do cancro da mama de fenótipo triplo negativo é um campo de investigação bastante interessante e promissor. Nos últimos anos, a fitoterapia tem-se afirmado como uma alternativa viável no tratamento e prevenção de diversos tipos de doenças, incluindo o cancro.

Na região do Alentejo existe uma quantidade apreciável de biomassa lenhocelulósica derivada de Cc cultivada e selvagem, uma planta reconhecidamente rica em diversos fitoquímicos. A grande heterogeneidade, em termos de compostos fenólicos totais e flavonóides de diferentes fracções extractáveis resultantes das raízes, caules, folhas e flores de plantas frescas *versus* secas, das variedades cultivada e selvagem de Cc despertou o interesse na investigação das suas actividades biológicas.

Poucos estudos demonstram o efeito anti-proliferativo de extractos de Cc em linhas celulares cancerígenas e até agora não foi realizado qualquer estudo que diferenciasse os extractos obtidos de diferentes partes da planta. O presente trabalho sublinha assim, o papel de diferentes extractos de Cc, nomeadamente extractos de FCF e CCF, e o seu pronunciado efeito anti-proliferativo em células de carcinoma hepatocelular e de cancro da mama de fenótipo triplo negativo. Para além do mais, o estudo do efeito de extractos, ricos em compostos polifenólicos, na via molecular do PI3K/AKT/mTOR está ainda pouco explorado. Este estudo mostra que o extracto de FCF de Cc potencialmente afecta o mecanismo de sinalização de PI3K/AKT/mTOR, contribuindo para a compreensão da actividade anti-proliferativa demonstrada, e em simultâneo, abrindo portas para o desenvolvimento de novas terapias fitoquímicas.

No entanto, muito pode ainda ser feito no sentido de perceber se os extractos de Cc afectam a sinalização da via do PI3K/AKT/mTOR noutros substratos fundamentais na sinalização. Futuramente ainda pretende-se compreender qual o efeito dos extractos na activação de AKT, analisando, para isso, o nível de expressão proteica de pAKT, e a expressão génica, por RT-PCR e PCR em Tempo Real, de *Akt1*, *Akt2* e *Akt3*. Adicionalmente, seria também interessante analisar o efeito dos mesmos extractos na inibição de mTOR, incubando as células com os extractos de Cc e com rapamicina, um antibiótico que inibe especificamente mTOR.

Este trabalho representa a primeira abordagem investigacional, na tentativa de determinar a actividade biológica, de pois extractos de Cc, que embora obtidos a partir das mesmas plantas, apresentam distintos perfis fitoquímicos. Adicionalmente, com

base nos resultados obtidos, o extracto da FCF parece influenciar os níveis de expressão proteica da AKT, identificando assim, um alvo molecular potencialmente muito interessante, na perspectiva de novas terapias dirigidas para tumores refractários ao tratamento e com mau prognóstico.

Esperamos, assim, com estes estudos demonstrar que os extractos de *Cynara cardunculus* podem ser uma opção quimiopreventiva a considerar na prevenção e/ou tratamento do CHC e do cancro da mama de fenótipo triplo negativo.

F. Referências Bibliográficas

- Adams, L., Phung, S., Yee, N., Seeram, N., Li, L. & Chen, S.. (2010). Blueberry Phytochemicals Inhibit Growth and Metastatic Potential of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Cancer Research*, 70 (9), 3594-3605.
- Altomare, D., & Testa, J. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24 (50), 7455-64.
- Archivio, M., Santangelo, C., Scazzocchio, B., Vari, R., Filesi, C., Masella, R. & Giovannini, C. (2008). Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (3), 213-228.
- Arts, I., & Hollman, P. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 317-325.
- Asnaghi, L., Bruno, P., Priulla, M., & Nicolini, A. (2004). mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacological Research*, 50, 545-549.
- Beevers, C., Li, F., Liu, L. & Huang, S. (2006). Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *International journal of cancer*, 119 (4), 757-64.
- Biesalski, H., Dragsted, L. & Elmadfa, I. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25 (11-12), 1202-1205.
- Birt, D., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 90 (2-3), 157-177.
- Bosetti, C., Levi, F., Boffetta, P., Lucchini, F., Negri, E. & La Vecchia, C. (2008). Trends in Mortality from Hepatocellular Carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*, 48 (1), 137-145.
- Bosetti, C., Spertini, L., Parpinel, M., Gnagnarella, P., Lagiou, P., Negri, E., Franceschi, S., Montella, M., Peterson, J., Dwyer, J., Giacosa, A. & La Vecchia, C. (2005) Flavonoids and Breast Cancer Risk in Italy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 14 (4), 805-808.
- Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H., Czupalla, C., Michalke, M. & Spicher, K. (2003). Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *The Journal of cell biology*, 160 (1), 89-99.
- Campbell, I., Russell, S., Choong, D., Montgomery, K., Ciavarella, M., Hooi, C., Cristiano, B., Pearson, R. & Phillips, W. (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*, 64 (21), 7678-81.
- Capasso, F., Gaginella, T., Grandolini, G., Izzo, A., (2003). *Phytotherapy: A Quick Reference to Herbal Medicine*. Springer.

- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9 (6), 653-660.
- Carnero, A. (2009). Novel inhibitors of the PI3K family. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 18 (9), 1265-1278.
- Carvalho, S., Milanezi, F., Costa, J., Amendoeira, I. & Schmitt, F. (2010). PIKING the right isoform: the emergent role of the p110beta subunit in breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 456 (3), 235-243.
- Chen, J., Wang, Q., Fu, X., Huang, X., Chen, X., Cao, L., Chen, L., Tan, H., Li, W., Bi, J. & Zhang, L. (2009). Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatology Research*, 39, 177-186.
- Chen, P., Hsieh, Y., Chiou, H., & Chu, S. (2005). Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways. *Chemico-biological interactions*, 156 (2-3), 141-50.
- Chien, C., Shen, K., Huang, J., Ko, S., & Shih, Y. (2009). Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K / Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2 / 9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*.
- Ciraolo, E., Lezzi, M., Marone, R., Marengo, S., Curcio, C., Costa, C., Azzolino, O., Gonella, C., Rubinetto, C., Wu, H., Dastrù, W., Martin, E., Silengo, L., Altruda, F., Turco, T., Lanzetti, L., Musiani, P., Rückle, T., Rommel, C., Backer, J., Forni, G., Wymann, M., & Hirsch, E. (2008). Phosphoinositide 3-Kinase p110 β Activity: Key Role in Metabolism and Mammary Gland Cancer but Not Development. *Sci. Signal.*, 1 (369), 3.
- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The lancet oncology*, 8 (3), 235-44.
- Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., Acquadro, A., Romani, A., Hehn, A., Larbat, R. & Bourgaud, F. (2007). Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L. *BMC Plant Biology*, 14, 1-14.
- Conforti, F., Ioele, G., Statti, G. A., Marrelli, M., Ragno, G. & Menichini, F. (2008). Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (10), 3325-3332.
- Cooray, H., Janvilisri, T., Veen, H., Hladky, S., & Barrand, M. (2004). Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 269-275.

- Cragg, G., Grothaus, P., & Newman, D. (2009). Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents . *Chem. Rev.*, 109, 3012-3043.
- Cravotto, G., Boffa, L., Genzini, L., & Garella, D. (2010). Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 35 (1), 11-48.
- Curt, D., & Aguado, P. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus* L . for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, 24, 222-229.
- Curt, M., Sánchez, G. & Fernández, J., (2002). The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass Bioenergy*, 23 (1), 33–46.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. & Castanas, E. (2000). Potent Inhibitory Action of Red Wine Polyphenols on Human Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78(3), 429–441.
- Deep, G. & Agarwal, R. (2007). Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integr. Cancer Ther.*, 6 (2), 130-145.
- Dillon, R., & Muller, W. (2010). Distinct Biological Roles for the Akt Family in Mammary Tumor Progression. *Cancer Research*, 70 (11), 4260-4264.
- Dillon, R., White, D. & Muller, W. (2007). The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene*, 26, 1338–1345.
- Dumitrescu, R. & Cotarla, I., (2005). Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?. *J Cell Mol Med*, 9, 208-221.
- El-Serag, H. (2004). Hepatocellular Carcinoma: Recent Trends in the United States. *Gastroenterology*, 127 (5), 27–34.
- Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W. & Eric Raymond, E., (2007). Case history: Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 734-745.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., & Karray-bouraoui, N. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L . organs , and their biological activities. *Biotechnology*, 331, 372-379.
- Faller, A. L., & Fialho, E. (2010). Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1-8.
- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, & Chen, J (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294, 1942–1945.

- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(3), 581-92.
- Fernández, J. & Curt, M. (2004). Low cost biodiesel from *Cynara*. *Proceedings of the Second World Biomass Conference, Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*, 10–14 May, vol. I. Rome, Italy. ETA-Florence and WIP-Munich (Pub.), 109–112.
- Fernández, J., Curt, M. & Aguado, L. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, 24 (3), 222-229.
- Foukas, L., Berenjano, I., Gray, A., Khwaja, A., & Vanhaesebroeck, B. (2010). Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival. *PNAS*, 1-6.
- Foukas, L., Claret, M., Pearce, W., Okkenhaug, K., Meek, S., Peskett, E., Sancho, S., Smith, A., Withers, D. & Vanhaesebroeck, B. (2006). Critical role for the p110 α phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature*, 441, 3-7.
- Fröjdö, S., Cozzone, D., Vidal, H. & Pirola, L. Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor. *The Biochemical journal*, 406 (3), 511-518.
- Garg, A., Buchholz, T., & Aggarwal, B. (2005). Chemosensitization and Radiosensitization of Tumors by Plant Polyphenols. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (11-12), 1630-1647.
- Gaudet, M., Bensen, J., Schroeder, J., Olshan, A., Terry, M., Eng, S., Teitelbaum, S., Britton, J., Lehman, T. & Neugut, A., (2006). Catechol-O-methyltransferase haplotypes and breast cancer among women on Long Island, New York. *Breast cancer Research Treatment*, 99, 235-240.
- Gomaa, A., Khan, S., Toledano, M., Waked, I., Taylor-Robinson, S. & Taylor-Robinson, S. (2008). Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *Journal of Gastroenterology*, 14 (27), 4300-4308.
- Gominho, J., Fernandez, J. & Pereira, H. (2001). *Cynara cardunculus* L. — a new fibre crop for pulp and paper production. *Industrial Crops and Products*, 13 (1), 1-10.
- Granado-Serrano, A., Martín, M., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *The Journal of nutrition*, 136 (11), 2715-2721.

- Grey, A., Chaussade, C., Empson, V., Lin, J., Watson, M., Sullivan, S. O., Rewcastle, G., Naot, D., Cornish, J. & Shepherd, P. (2010). Evidence for a role for the p110- a isoform of PI3K in skeletal function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 564-569.
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K., Stephens, L. R., & Hawkins, P. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, 34, 647-662.
- Hay, N. & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18, 1926–1945.
- Hirsch, E., Ciruolo, E., Ghigo, A., & Costa, C. (2008). Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay. *Pharmacology & Therapeutics*, 118, 192-205.
- Jiang, B., & Liu, L. (2008). PI3K / PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Cell*, 1784, 150 - 158.
- Kim, D., Sarbassov, D., Ali, S., King, J., Latek, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D., (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110 (2), 163–75.
- Kim, D., Sarbassov, D., Ali, S., Latek, R., Guntur, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D., (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11 (4), 895–904.
- Krymskaya, V., Ammit, A., Hoffman, R., Eszterhas, A., & Panettieri, R. (2001). Activation of class IA PI3K stimulates DNA synthesis in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 280 (5), 1009-1018.
- Lampe, J. W. (2009). Interindividual differences in response to plant-based diets : implications for cancer risk 1 – 4. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1553-1557.
- Lee, L., Choi, E., Jin, C. & Kim, D., (2005). Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CAmRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol. Oncol.*, 97, 26–34.
- Lee, W., Wu, L., Chen, W., Wang, C., & Tseng, T. (2006). Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor / scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK / ERKs and PI3K – Akt pathways. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 123-133.

- Levine, D., Bogomolny, F., Yeel, C., Lash, A., Barakat, R., Borgen, P. & Boyd, J., (2005). Frequent Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancers. *Clinical Cancer Research*, 11, 2875.
- Liu, R. (2004). Nutrition and Cancer Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action 1. *The Journal of nutrition*, 134, 3479-3485.
- Lopiccolo, J., Blumenthal, G., Bernstein, W., & Dennis, P. (2008). Targeting the PI3K / Akt / mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*, 11, 32-50.
- Loures, M., Porto, C., Machado, K., Alves, M., Medeiros, M., Visconde, V. & Pereira, M. (2010). Contribuições da fitoterapia para a qualidade de vida: percepções de seus usuários. *Rev. enferm. UERJ*, 18(2), 278-283.
- Mann, C., Neal, C., Garcea, G., Manson, M., Dennison, A. & Berry, D., (2009). Phytochemicals as potential chemopreventive and chemotherapeutic agents in hepatocarcinogenesis. *Eur J Cancer Prev.* 18 (1), 13-25.
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129 (7), 1261-74.
- Martelli, A., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., Manzoli, L. & Mccubrey, J. (2009). Targeting the PI3K / AKT / mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 18 (9), 1333-1349.
- Mayo, L., & Donner, D., (2001). A phosphatidylinositol 3- kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 11598–603.
- Mazzanti, R., Gramantieri, L. & Bolondi, L. (2008). Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and clinical aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 29, 130–143.
- 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 .. *Phytother. Res.* 22, 77- 81.
- Miccadei, S., Di Venere, D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M., Fraioli, R., Mobarhan, S. & Maiani, G. (2008). Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutrition and cancer*, 60 (2), 276-283.
- Muwaji, P., Nagy, M., & Krajwowski, J. (2004). Triterpenoid *Cynara* saponins from *Cynara cardunculus* L . reduce chemically induced mutagenesis in vitro. *Phytomedicine*, 11, 673-678.
- Myers, A., & Cantley, L. (2010). Targeting a Common Collaborator in Cancer Development. *Cancer Drug Discovery*, 2 (48), 48-45.

- Newman, D., Cragg, G. & Snader, K. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.*, 66, 1022–1037.
- Nishino, H., Satomi, Y., Tokuda, H. & Masuda, M. (2007). Cancer control by phytochemicals. *Curr. Pharm. Des.*, 13, 3394–3399.
- Osaki, M., Oshimura, M., & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9, 667-676.
- Peterson, J., Lagiou, P., Samoli, E., Lagiou, A., Katsouyanni, K., La Vecchia, C., Dwyer, J. & Trichopoulos, D. (2003). Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *British Journal of Cancer*, 89 (7), 1255 – 1259.
- Petrovic, S., Mucaji, P., & Sokovic, M. (2008). Food Chemistry Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107, 861-868.
- Phillipson, J. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56 (3), 237-43.
- Poon, R. & Fan, S. (2004). Resection Prior to Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Strategy of Optimizing the Role of Resection and Transplantation in Cirrhotic Patients With Preserved Liver Function. *Liver Transplantation*, 10 (6), 813–815.
- Pozo-Guisado, E., Lorenzo-Benayas, M., & Fernández-Salguero, P. (2004). Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *International journal of cancer.*, 109 (2), 167-73.
- Raccuia, S., & Melillia, M., (2007). Biomass and grain oil yields in *Cynara cardunculus* L. genotypes grown in a Mediterranean environment. *Field Crops Research*, 101, 187-197.
- Rakha, E., El-Sayed, M., Green, A., Lee, A., Robertson, J., & Ellis, I. (2007). Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer*, Volume 109 , Number 1, 25-32.
- Ramasamy, K. & Agarwal, R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters*, 269, 352–362.
- Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18 (7), 427-42.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res*, 52, 507 - 526.
- Reddy, L., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Natural products for cancer prevention : a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99, 1 - 13.

- Reis-Filho, J., & Tutt, A. (2008). Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 52 (1), 108-118.
- Rowe, D., Ozbay, T., O'Regan, R. & Nahta, R. (2009). Modulation of the BRCA1 protein and induction of apoptosis in triple negative breast cancer cell lines by the polyphenolic compound curcumin. *Breast Cancer (Auckl)*, 2 (3), 61–75.
- Sakamoto, M., D, P., Yamasaki, S., & D, P. (2004). Akt Phosphorylation Is a Risk Factor for Early Disease Recurrence and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer*, 103 (2), 1-6.
- Sarbassov D, Ali S, Kim D, Guertin D, Latek R, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sabatini D (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14 (14), 1296–302.
- Sarbassov, D., Guertin, D., Ali, S. & Sabatini, D., (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307 (5712), 1098–101.
- Sarkar, F. & Li, Y., (2004). The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Front Biosci*, 9, 2714–24.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N. & Ghidoni, R. (2003). Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17 (15), 2339-41.
- Schneider, B., Winer, E., Foulkes, W., Garber, J., Perou, C., Richardson, A., Sledge, G. & Carey, L. (2008). Triple-Negative Breast Cancer: Risk Factors to Potential Targets. *Clinical cancer research*, 14 (24), 8010-8018.
- Siddiqui, I. A., Adhami, V. M., Afaq, F., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2004). Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 91(2), 232-242.
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J. & Hawkins, P.T., (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, 279, 710–714.

- Sun, Y., Wu, J., & Liu, C. (2007). A comparison of transition state of phenol in H-atom abstraction by methyl and methylperoxyl radicals. *Chinese Science Bulletin*, 52 (9), 1182-1186.
- Tee, A. R., & Blenis, J. (2005). mTOR, translational control and human disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16, 29-37.
- Tempst, P., Coadwell, J. & Hawkins, P. (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, 279 (5351), 710–714.
- Testa, J. R., & Tsichlis, P. N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*, 24(50), 7391-7393.
- Thangapazham, R., Singh, A., Sharma, A., Warren, J., Gaddipati, J. & Maheshwari, R. (2007). Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Cycle*, 245, 232-241.
- Tokunaga, C., Yoshino, K. & Yonezawa, K., (2004). mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 443–446
- Tyagi, A., Agarwal, C. & Agarwal, R. (2002). The cancer preventive flavonoid silibinin causes hypophosphorylation of Rb/p107 and Rb2/p130 via modulation of cell cycle regulators in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cell Cycle*, 1(2), 137-142.
- Velez, Z., Guerra, A., Ramos, P., Guerreiro, O., Felício, L., Schmitt, F. & Duarte, M. Biological characterization of *Cynara cardunculus* L. methanolic extracts: antioxidant and anti-tumoral activities. Submitted to *Food Chemistry*.
- Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., & Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals of Oncology*, 16, 525 - 537.
- Yap, T. A., Garrett, M. D., Walton, M. I., Raynaud, F., Bono, J. S. & Workman, P. (2008). Targeting the PI3K – AKT – mTOR pathway : progress , pitfalls , and promises. *Current Opinion in Pharmacology*, 8:393-412.

G. Anexos

Anexo I – Protocolos

i. Descongelamento das células

- 1) Descongelar o *vial* em banho-maria a 37 ° C. O descongelamento deve ser rápido.
- 2) Transferir o conteúdo do *vial* para um tubo, adicionar 9 mL de meio de cultura, a 37°C.
- 3) Centrifugar 2500 rpm, 5 min. à temperatura ambiente.
- 4) Aspirar o meio. Ressuspender as células em 5mL de meio de cultura.
- 5) Transferir para frascos de cultura de 25cm².
- 6) Incubar a 37°C, 5% CO₂.
- 7) Mudar o meio após 24h.

ii. Subcultura de células

- 1) Remover e desprezar o meio de cultura.
- 2) Lavar as células com PBS estéril a 37°C.
- 3) Adicionar tripsina (2mL para frascos de 25cm²).
 - a. HepG2
 - i. Incubar a 37°C durante dois minutos. Adicionar meio até perfazer o volume total do frasco. Destacar as células com a ajuda de um *cell scraper*. Adicionar alíquotas adequadas da suspensão celular para novos frascos de cultura.
 - b. MDA-MB-231
 - i. Esperar breves instantes até ao destacamento das células. Adicionar meio até perfazer o volume total do frasco. Adicionar alíquotas adequadas da suspensão celular para novos frascos de cultura.

iii. Determinação da viabilidade celular por azul de tripano

- 1) Preparar um hemocitómetro com lamela.
- 2) Pipetar para um microtubo, 20 μ L de azul de tripano e 20 μ L da suspensão celular e misturar.
- 3) Permitir que uma gota de suspensão misturada flua por acção capilar sob a lamela do hemocitómetro, de modo a ocupar completamente o compartimento de medição, sem transbordar.
- 4) Com um microscópio, contar as células viáveis (que excluem o azul de tripano) e não viáveis (que incorporam azul de tripano) utilizando diferentes campos da câmara (e diferentes quadrados de contagem)
- 5) Considerando-se as diluições feitas, calcular a concentração de células viáveis por mililitro de suspensão.

iv. Preparação de *pellets* celulares para a extracção de ARN

- 1) Incubar células na concentração de 5×10^5 células/mL durante 48h.
- 2) Aspirar o meio de cultura.
- 3) Adicionar 4 mL de tripsina. Neutralizar a tripsina por adição de 6 mL de meio de cultura.
- 4) Destacar as células do frasco com a ajuda de um *cell scraper*.
- 5) Centrifugar a suspensão durante 2500 rpm, 5 min, à temperatura ambiente.
- 6) Aspirar o meio e guardar a *pellet* a -80°C , até utilização.

v. Extracção de ARN

(*RNeasy® Mini Kit, Quiagen*)

- 1) Romper as células por adição do tampão RLT. Pipetar para misturar.
- 2) Adicionar um volume de etanol a 70% para homogeneizar o lisado e misturar por pipetagem.

- 3) Transferir 700 μ L da amostra, para uma coluna *RNeasy spin* em tubo de colheita. Centrifugar 15s a 10 000 rpm. Desprezar o filtrado.
- 4) Adicionar 700 μ L de tampão RW1 à coluna. Centrifugar 15s a 10 000 rpm. Desprezar o filtrado.
- 5) Adicionar 500 μ L de tampão RPE à coluna. Centrifugar 15s a 10 000 rpm. Desprezar o filtrado.
- 6) Adicionar 500 μ L de tampão RPE à coluna. Centrifugar 2 min a 10 000 rpm.
- 7) Colocar a coluna num novo tubo de colheita e centrifugar à velocidade máxima durante 1min.
- 8) Colocar a coluna num tubo de colheita de 1,5mL e adicionar 30-50 μ L de água sem RNases directamente na membrana da coluna. Centrifugar durante 1 min. a 10 000 rpm.
- 9) Guardar o ARN a -80°C.

vi. Avaliação da integridade do ARN por electroforese em gel de agarose

- 1) Preparar um gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 1x preparado em Dietilpirocarbonato (DEPC) em H₂O 0,1% v/v, com Brometo de Etídio.
- 2) Preparar as amostras de ARN a aplicar no gel. Adicionar em microtubos:
 - a. 1 μ L de corante (*loading dye*);
 - b. 3 μ L de H₂O-DEPC 0,1% v/v;
 - c. 2 μ L de amostra de ARN.
- 3) Aplicar as amostras no gel.
- 4) Efectuar a corrida electroforética em tampão TBE 1x preparado em H₂O-DEPC 0,1% v/v, a 90 *Volts* (V) durante 30-40 min.
- 5) Visualizar em transiluminador UV (GelDoc, Biorad).

vii. Determinação da concentração de ARN

- 1) Diluir 5 μ L da amostra de ARN em 95 μ L de H₂O-DEPC 0,1% v/v.

- 2) Ler a absorvância em espectrofotómetro a 260nm e 280nm. Como branco utilizar H₂O DEPC.
- 3) Uma unidade de absorvância corresponde a 44 µg de ARN por mL ($A_{260}=1 \rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$). A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) fornece uma estimativa da pureza do ARN, no que diz respeito aos contaminantes que absorvem na gama de UV, tais como proteínas.

viii. Síntese de cADN

(*QuantiTect® Reverse Transcription*)

- 1) Descongelar o ARN no gelo. Descongelar os reagentes à temperatura ambiente.
- 2) Preparar a eliminação de ADN genómico no gelo de acordo com o quadro seguinte:

Tabela 2: Componentes da reacção de eliminação de ADN genómico.

	Volume/reacção	Concentração Final
Tampão gDNA <i>Wipeout</i> , 7x	2 µL	1x
ARN	1 µg	
Água sem RNases	variável	
Volume Total	14 µL	-

- 3) Incubar 2 min. a 42°C. Colocar imediatamente em gelo.
- 4) Preparar a mistura de reacção de acordo com a tabela:

Tabela 3: Componentes da reacção de transcriptase reversa.

Componente	Volume/reacção	Concentração Final
Transcriptase Reversa <i>Quantiscript</i>	1 µL	
Tampão RT <i>Quantiscript</i> , 5x	4 µL	1 x
<i>RT Primer Mix</i>	1 µL	
Volume total da eliminação de ADN genómico	14 µL	
Volume Total	20 µL	-

- 5) Incubar 15min. a 42°C.
- 6) Incubar 3min. a 95°C.

Condições das reacções de PCR para os genes em estudo

Tabela 4: Sequência de oligonucleótidos para os vários genes em estudo e gene de referência, condições específicas da reacção de PCR e o respectivo tamanho do fragmento esperado.

Identificação do gene	Condições específicas da reacção de PCR	Sequência	Tamanho em pb	Referência
p110- α	Desnaturação: 95°C – 30seg. Emparelhamento: 56°C- 1min. Extensão: 72°C – 1min. Nº de ciclos: 35	F: 5'-CTGTGTGGGACTTATTGAGGTGGTGC-3' R: 5'-GGCATGCTGTCTCGAATAGCTAGATAAGC-3'	452	Krymskaya <i>et al.</i> , 2001
p110- β	Desnaturação: 94°C – 30seg. Emparelhamento: 56°C - 30seg. Extensão: 72°C – 30 seg. Nº de ciclos: 30	F: 5'-GAAGATTGCAAGCAGTGATAGTGC-3' R: 5'-CCTATCCTCCGATTACCAAGTCGTC-3'	432	
p110- γ	Desnaturação: 94°C – 30seg. Emparelhamento: 55°C - 30seg. Extensão: 72°C – 30 seg. Nº de ciclos: 35	F: 5'-GCTTGAAAACCTGCAGAATTCTCAAC-3' R: 5'-CGTCTTTCACAATCTCGATCATCC-3'	346	
β -actina	Desnaturação: 95°C – 1min30seg. Emparelhamento: 56°C - 1min. Extensão: 72°C – 2min. Nº de ciclos: 35	F: 5'-AGAAAATCTGGCACCCACACC-3' R: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'	200	-

ix. Obtenção de lisados proteicos para *western blot*

- 1) Após as 48h de incubação, aspirar o meio de cultura.
- 2) Adicionar PBS a 4°C.
- 3) Destacar as células do frasco com a ajuda de um *cell scraper*.
- 4) Centrifugar a suspensão durante 2000 rpm, 3 min, a 4°C.
- 5) Aspirar o PBS e ressuspender em volume igual de PBS. Repetir a lavagem 3 vezes.
- 6) Aspirar o PBS e adicionar o tampão de lise (*Catenin lysis buffer*) e inibidores de proteases, diluídos 1:7.
 - a. *Catenin lysis buffer*
 - i. 1% v/v triton X-100
 - ii. 1% v/v NP-40
 - iii. PBS diluído
- 7) Depois de agitar, deixar 10min., 4°C.
- 8) Centrifugar a 14 000 rpm durante 10min., 4°C.
- 9) Recolher o sobrenadante (lisado proteico total) para um novo microtubo e guardar a -80°C.

x. Determinação da concentração de proteína total nos lisados proteicos

a) Curva padrão

- 1) Preparar uma solução de BSA de 1mg/mL, pipetar para microtubos o volume correspondente para obter 2, 5, 10, 20, 40 e 60 µg de proteína e adicionar água ultra-pura até um volume final de 200µL. Realizar o procedimento como descrito para a quantificação das amostras.

b) Quantificação das amostras

- 2) Pipetar 20 μ L de amostra para um microtubo e adicionar água ultra-pura até um volume final de 200 μ L. Preparar, de igual modo, um branco contendo água-ultra pura em vez de amostra.
- 3) Adicionar 1 mL de reagente cupro-alcálico e misturar de imediato no vórtex. Incubar durante 10min. à temperatura ambiente.
- 4) Adicionar 100 μ de reagente de Folin-Ciocalteu e misturar de imediato no vórtex. Incubar durante 30min., à temperatura ambiente.
- 5) Homogeneizar as misturas e transferir o conteúdo para cuvettes de plástico de 1,5mL. Ler a absorvância a 750nm contra o branco, usando a curva de calibração previamente preparada com BSA como padrão.

xi. Western blot

a) SDS-PAGE

i. Preparação das amostras

- 1) Descongelar as amostras no gelo.
- 2) Calcular o volume de amostra a aplicar de forma que a quantidade de proteína seja igual em cada poço.
- 3) Adicionar o tampão da amostra.
- 4) Incubar as amostras 10min, a 100°C.
- 5) Após este tempo retirar e colocar imediatamente em gelo.
- 6) Centrifugar 14 000rpm durante 1min e manter em gelo.

ii. Electroforese

- 7) Montar o sistema de electroforese.

- 8) Preparar o gel de resolução de acrilamida 15%. Deixar solidificar.
- 9) Preparar o gel de concentração e colocar o pente. Deixar solidificar e retirar o pente.
- 10) Aplicar as amostras e marcador.
- 11) Iniciar a electroforese 60V durante aproximadamente 45min.
- 12) Quando a frente da corrida passa para o gel de resolução, aumentar a voltagem para 100v durante 1h.

b) Transferência (tipo *tank-blotting* - Hoefer[®])

- 1) Após retirar o gel do sistema de electroforese, remover o gel de concentração equilibrar o gel e embeber a membrana de PVDF, em tampão de transferência.
- 2) Preparar a *sandwich* do gel:

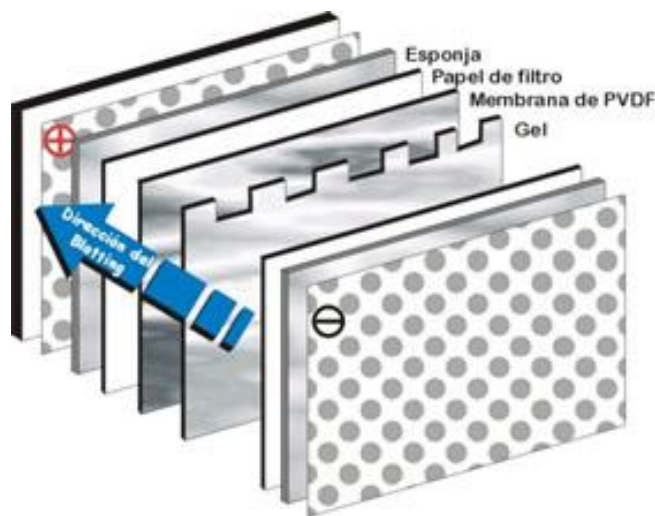


Figura 25: Esquema representativo da montagem da *sandwich* para a transferência. (adaptado de http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Western_blotting)

- 3) Transferir durante 1h, 100V, 250mA.

c) Incubação com anticorpos

- 1) Bloquear sítios de ligação não específica na membrana com o tampão de bloqueio.

- 2) Incubar a membrana com o anticorpo primário *overnight*, a 4°C.
- 3) Lavar 3 vezes com TBS-Tween (1% Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20).
- 4) Incubar a membrana com o anticorpo secundário 45min. à temperatura ambiente.
- 5) Lavar 3 vezes com TBS-Tween (1% Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20).

d) Detecção

- 1) Incubar membranas com o reagente de detecção *ECL Plus* (GE Healthcare) durante 1 min., segundo as instruções do fabricante.
- 2) Retirar o excesso de reagente da membrana e colocá-la dentro de película transparente.
- 3) Colocar as membranas numa uma cassete de filme de raio-X e expor a um filme de autoradiografia. Em seguida, desenvolver o filme.