



**Glória de Fátima da  
Silva Figueiredo**

**Estudo do efeito de extrato de chá verde no cancro  
da mama: monitorização *in vitro* e em modelo animal**

**Effect of a green tea extract in breast cancer: study  
*in vitro* and in animal model**



**Glória de Fátima da  
Silva Figueiredo**

**Estudo do efeito de extrato de chá verde no cancro da  
mama: monitorização *in vitro* e em modelo animal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor João Filipe Calapez de Albuquerque Veloso, Professor Associado com Agregação do Departamento de Física da Universidade de Aveiro, e coorientação da Doutora Ana Cristina Aguiar Santos, Investigadora Auxiliar de Nomeação Definitiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (IBB – iCBR - CIBB).

A presente dissertação foi parcialmente apoiada pelos projetos CENTRO-01-0247-FEDER-039880 (iPET) e PTDC/EMD-EMD/2140/2020, tendo sido desenvolvida no âmbito do i3N (UIDB/50025/2020 & UIDP/50025 /2020), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC COMPETE, FEDER e POCI.

Aos meus pais, por serem a definição mais bonita de amor...

## **O júri**

Presidente

**Prof. Doutor Luiz Fernando Ribeiro Pereira**

Professor Auxiliar do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

Vogais

**Prof. Doutor Bruno Miguel Bernardes de Jesus**

Professor Auxiliar do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Cristina Aguiar Santos**

Investigadora Auxiliar de Nomeação Definitiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (IBB – iCBR - CIBB)

## Agradecimentos

Escrevo estas palavras imbuída pela surrealidade inerente à conclusão deste capítulo. Se, inicialmente, Engenharia Biomédica traduzia a divergência ao sonho da minha vida, hoje, estou convicta de que foi o caminho alternativo mais bonito para a sua concretização. Os últimos 5 anos foram a conjugação perfeita dos verbos: crescer, avançar, acreditar e agradecer. Este último, neste momento, adquire uma especial conotação. Desta forma, conjugo-o, na primeira pessoa, de forma sentida, lembrando-me das pessoas que são remo e âncora da minha vida: Pai, Mãe, Miguel e cada um dos elementos da família que o coração escolheu e guarda para sempre.

No âmbito do desenvolvimento da presente dissertação, a qual esconde nas entrelinhas o desafio, o esforço e a dedicação, expresse o meu genuíno agradecimento pela ajuda concedida por diversas pessoas e entidades. Assim, agradeço ao Prof. Doutor João Veloso, por toda a estrutura de acompanhamento proporcionada. Reconheço todo o seu esforço e a constante liberdade orientada. À Doutora Ana Cristina Santos, declaro a minha sincera admiração, por ter sido incansável no acompanhamento de todas as fases de desenvolvimento da presente dissertação, dando verdadeiramente sentido à definição de orientação. Toda a bagagem de conhecimento que me ajudou a construir e cada um dos seus carinhosos conselhos são a prova de que a conclusão deste capítulo fez ainda mais sentido com a sua orientação. Ficarà, para a vida, no meu coração.

Agradeço, também, à equipa da RI-TE pelo suporte a toda a componente imagiológica do presente estudo. Em especial, reconheço o contributo da Prof. Doutora Ana Luísa Silva, sempre disponível e atenta a toda a evolução deste trabalho. Obrigada pelos sorrisos de conforto que soavam a confiança a cada início de semana. Gratifico, ainda, a Fabiana Ribeiro, pela intensa partilha de conhecimento e constante orientação. Senti verdade e entrega a cada pedido de ajuda retribuído.

Um obrigada eterno e envolvido com todo o meu carinho à Mariana Marques, a maior dádiva da vida ao longo deste último ano. Construímos, juntas, o sentido de companheirismo, entreaajuda e amizade. Guardo nas memórias do coração não só todos os momentos hilariantes, mas também o conforto, o alento e a confiança dos abraços que foram abrigo. Um agradecimento especial à Rute Santos, mentora e inspiração no início desta jornada, e à Patrícia Matos, pessoa-luz e confiança ao longo de todos estes meses. O coração não esquece, ainda, a para sempre minha Carolina “Pequenina”, a Sofia, a Bruna, o Hugo e a Carolina J., por terem sido as melhores personagens a dar sentido a todas as histórias escritas no laboratório. A palavra gratidão estará sempre associada aos vossos rostos.

Por último, uma palavra de apreço à Prof. Doutora Bárbara Oliveiros, pela simpatia e disponibilidade para a orientação no tratamento estatístico dos dados, assim como à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), ao *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research* (iCBR), ao Grupo de Biofísica (iBB), ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e ao *Vivarium* do iCBR-FMUC pelos fundamentais recursos disponibilizados.

## Palavras-chave

Extrato de chá verde, *easyPET.3D*, cancro da mama, metastização óssea, células MCF-7, estudos *in vitro* / *in vivo*.

## Resumo

Dados estatísticos recentemente divulgados pela Organização Mundial de Saúde revelam que o cancro corresponde à principal causa de morte na sociedade atual, destacando-se, o diagnóstico prevalente de cancro da mama, no sexo feminino. Esta doença oncológica tem preferencial propensão para a metastização óssea, a qual apresenta uma significativa mortalidade. Assim, o desenvolvimento da presente dissertação sustenta-se quer na relevância da investigação de terapêuticas que aliam eficácia à redução do seu efeito citotóxico, quer no estudo de metodologias capazes de promover um diagnóstico precoce. O chá verde apresenta na sua constituição várias catequinas, às quais estão associados mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e antimutagénicos. Como tal, avaliou-se *in vitro*, com a linha celular MCF-7, o potencial adjuvante do extrato de chá verde (GTE po), quando combinado com terapêuticas utilizadas em contexto clínico. Através do método colorimétrico de avaliação da viabilidade celular MTT, comprovou-se que o GTE po exhibe, isoladamente, ação terapêutica com uma probabilidade de 66%. Quando associado ao tratamento clínico direcionado à doença oncológica em estudo, o GTE po apresenta resultados promissores, nomeadamente nos protocolos: Paclitaxel + Gemcitabina; Docetaxel + Gemcitabina; 5-FU + Metotrexato + Ciclofosfamida; Denozumab; Vincristina + Epirrubicina + Ciclofosfamida. De forma complementar, desenvolveram-se ensaios *in vivo*, através da seleção de um modelo animal em murganho (da estirpe Balb/c *nude*) - indução não-ortotópica de tumor primário da mama e de simulação de metástases ósseas - com recurso à inoculação de células MCF-7. A sua monitorização foi realizada através da aquisição de imagens PET, utilizando o sistema *easyPET.3D*, com recurso aos radiofármacos [<sup>18</sup>F]-FDG e [<sup>18</sup>F]-NaF. A tecnologia *easyPET* demonstrou a sua enorme relevância ao longo do presente estudo, tendo sido capaz de detetar estádios muito precoces do desenvolvimento tumoral e de monitorizar a resposta à terapêutica administrada. Quanto ao impacto do tratamento, o modelo de indução de metástases ósseas, submetido à ação do Vincristina e do GTE po, apresentou uma redução dos valores de SUV<sub>médio</sub> e uma diminuição da captação de [<sup>18</sup>F]-NaF, ao fim de 3 ciclos de tratamento, o que permite constatar a ocorrência de uma regressão tumoral, tal como comprovam os resultados histológicos obtidos. Este animal apresentou, ainda, a recuperação da sua massa corporal, entre os ciclos intermédios de tratamento, o que pode estar relacionado com a administração diária de GTE po, cujas propriedades apontam para um incremento a sua qualidade de vida. Por outro lado, o modelo não-ortotópico de tumor primário da mama não permitiu avaliar a eficácia da terapêutica administrada (Docetaxel + GTE po). Contudo, sustenta o papel determinante do sistema *easyPET.3D* em contexto pré-clínico.

## Keywords

Green tea extract, easyPET.3D, breast cancer, bone metastasis, MCF-7 cells, *in vitro* / *in vivo* studies.

## Abstract

Recent statistical findings disclosed by the World Health Organization reveal that cancer is the leading cause of mortality in modern society, with breast cancer being the most prevalent within the female population. This oncological disease has a particular predisposition to bone metastasis, which presents a significant mortality rate. As such, the development of this dissertation focuses on the relevance of exploring therapies which combine effectiveness with reduced cytotoxicity, as well as investigating methodologies capable of promoting early diagnosis. Green tea contains several catechins, which possess antioxidant, anti-inflammatory and anti-mutagenic properties. Therefore, the adjuvant potential of Green Tea Extract powder (GTE po) was evaluated *in vitro* with the MCF-7 cell line, in combination with therapies commonly employed in clinical settings. The colorimetric method for evaluating cell viability MTT demonstrated that GTE po, in isolation, exhibits a therapeutic action with a probability of 66%. When coupled with clinical treatment directed to the oncological disease under analysis, the GTE po shows promising results, particularly in the protocols: Paclitaxel + Gemcitabine; Docetaxel + Gemcitabine; 5-FU + Methotrexate + Cyclophosphamide; Denozumab; Vincristine + Epirubicin + Cyclophosphamide. Additionally, *in vivo* tests were developed through the selection of an animal model in nude Balb/c mice - a non-orthotopic model of primary breast tumour and a model of bone metastasis induction simulation - by inoculating MCF-7 cells. Tumour monitoring was performed via PET imaging, using the easyPET.3D system, with the radiopharmaceuticals [<sup>18</sup>F]-FDG and [<sup>18</sup>F]-NaF. The easyPET technology demonstrated its remarkable importance throughout this study, being able to detect very early stages of tumour development and to assess the response to the administered therapy. Regarding the model of induction of bone metastases, submitted to the action of Vincristine and GTE po, a reduction in mean SUV values and a decrease in [<sup>18</sup>F]-NaF uptake was observed after 3 cycles of treatment. These results are consistent with the occurrence of tumour regression, as confirmed by the histological evidence. This animal also presented a recovery of its body mass, between the intermediate cycles of treatment. This may be related to the daily administration of GTE po, whose properties suggest an increase in its quality of life. On the other hand, the non-orthotopic model of primary breast tumour did not enable the evaluation of the efficacy of the administered therapy (Docetaxel + GTE po). However, it supports the decisive role of the easyPET.3D system in a pre-clinical context.

## Acrónimos e Abreviaturas

<b>[<sup>18</sup>F]-FDG</b>	[ <sup>18</sup> F]-Fluorodesoxiglicose
<b>[<sup>18</sup>F]-NaF</b>	[ <sup>18</sup> F]-Fluoreto de sódio
<b><sup>11</sup>C</b>	Carbono-11
<b><sup>13</sup>N</b>	Azoto-13
<b><sup>15</sup>O</b>	Oxigênio-15
<b><sup>18</sup>F</b>	Flúor-18
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracilo
<b>ATCC®</b>	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ião cálcio
<b>Ciclo</b>	Ciclofosfamida
<b>Cis</b>	Cisplatina
<b>DMEM</b>	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>Doce</b>	Docetaxel
<b>Doxo</b>	Doxorrubicina
<b>EC</b>	(-)-epicatequina
<b>ECG</b>	(-)-epicatequina-3-galhato
<b>EGC</b>	(-)-epigalhocatequina
<b>EGCG</b>	(-)-epigalhocatequina-3-galhato
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
<b>EGFR</b>	Recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>EMEM</b>	do inglês <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
<b>PR</b>	Recetor de Progesterona, do inglês <i>progesterone receptor</i>
<b>Epi</b>	Epirrubicina
<b>ER</b>	Recetor de Estrogénio, do inglês <i>estrogen receptor</i>
<b>FBS</b>	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FoV</b>	Campo de visão, do inglês <i>Field of View</i>
<b>Gem</b>	Gemcitabina
<b>GTE po</b>	do inglês <i>Green Tea Extract powder</i>
<b>H&amp;E</b>	Técnica histológica de rotina com Hematoxilina-Eosina
<b>HER2</b>	Recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2, do inglês <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Via intravenosa
<b>IARC</b>	Agência Internacional para a Investigação no Cancro, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>ICBR</b>	do inglês <i>Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research</i>
<b>ITN</b>	Instituto Tecnológico e Nuclear
<b>LOR</b>	Linha de Resposta, do inglês <i>Line of Response</i>
<b>MOCF</b>	Microscópio ótico de contraste de fase
<b>MRI</b>	Imagem por Ressonância Magnética, do inglês <i>Magnetic resonance imaging</i>
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>MTX</b>	Metotrexato
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>Pacli</b>	Paclitaxel
<b>Pen/Strep</b>	Penicilina/estreptomicina
<b>PET</b>	Tomografia por emissão de positrões, do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>
<b>PTH-rP</b>	Péptido relacionado com a hormona da paratiróide, do inglês <i>Parathyroid hormone-related protein</i>



<b>RANK</b>	Ativador do recetor para o ligando nuclear kappa-b
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Recetores de estrogénio alfa
<b>ROI</b>	Região de interesse, do inglês <i>Region of Interest</i>
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SPECT</b>	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único, do inglês <i>Single-Photon Emission Computerized Tomography</i>
<b>SUV</b>	do inglês <i>Standardized Uptake Value</i>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador beta, do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
<b>Trans</b>	Transtuzumab
<b>Vin</b>	Vincristina
<b>VOI</b>	Volume de interesse, do inglês <i>Volume of Interest</i>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1 - a)</b> Gráfico circular que integra a distribuição da totalidade mundial de novos casos de cancro diagnosticados em mulheres, no ano de 2020, de acordo com a diversidade de neoplasias. <b>b)</b> Gráfico referente aos números estimados da incidência e mortalidade associadas ao cancro, para ambos os sexos, a nível mundial. Apresentam-se os dados estatísticos mais recentes, relativos a 2020, assim como uma previsão a vinte anos para os referidos parâmetros (adaptado de [2]). .....	<b>1</b>
<b>Figura 2</b> – Estrutura anatómica da mama (adaptada de [17]). .....	<b>5</b>
<b>Figura 3</b> – Classificação do cancro da mama quanto às suas características moleculares intrínsecas (adaptado de [19]). .....	<b>6</b>
<b>Figura 4</b> – Progressão tumoral e etapas da cascata de metastização (adaptado de [21]). .....	<b>7</b>
<b>Figura 5</b> – Morfologia do osso (adaptado de [23]). .....	<b>8</b>
<b>Figura 6</b> – Ilustração da alteração da homeostase da remodelação óssea, induzida pelo desenvolvimento metastático (adaptado de [21]). .....	<b>9</b>
<b>Figura 7</b> – Representação do scanner PET convencional e dos princípios físicos que servem de base ao seu funcionamento (adaptado de [27]). .....	<b>10</b>
<b>Figura 8</b> - Descrição ilustrativa das diferentes etapas que constituem a preparação e garantia de funcionalidade do meio de cultura. ....	<b>16</b>
<b>Figura 9</b> – Ilustração do procedimento laboratorial associado à expansão das linhas celulares e descongelamento. ....	<b>17</b>
<b>Figura 10</b> – Sequência ilustrativa dos procedimentos necessários à manutenção da cultura celular.....	<b>18</b>
<b>Figura 11</b> – Síntese esquemática do protocolo de dissociação celular e possíveis procedimentos subsequentes. ....	<b>19</b>
<b>Figura 12</b> – Reprodução da metodologia adotada para a contagem de células e representação da câmara de Neubauer utilizada para o processo. ....	<b>20</b>
<b>Figura 13</b> - Esquema exemplificativo do desenho experimental de 1 ensaio <i>in vitro</i> para um protocolo terapêutico clínico. De acordo com a distribuição, são estudados os agentes quimioterapêuticos isoladamente (A e B), em conjunto (A+B) e associados ao agente coadjuvante natural em estudo – GTE po (A + GTE (0,5 - 5 - 10 µg/ml); B + GTE (0,5 - 5 - 10 µg/ml); A+B + GTE (0,5 - 5 - 10 µg/ml);.....	<b>23</b>
<b>Figura 14</b> – Esquema da metodologia que serve de base à medição da viabilidade celular. ....	<b>24</b>
<b>Figura 15</b> – Processo ilustrativo do desenvolvimento do modelo animal de tumor primário da mama e de tumor metastático da mama. ....	<b>26</b>
<b>Figura 16</b> – Síntese do protocolo relativo ao processo de aquisição de imagem.....	<b>28</b>

<b>Figura 17</b> - Metodologia para processamento histológico de rotina (H&E) e posterior observação. ....	<b>30</b>
<b>Figura 18</b> - Diagrama de extremos e quartis para os resultados de MTT obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico isolado do GTE po <i>MyProtein</i> <sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>32</b>
<b>Figura 19</b> – Diagrama de extremos e quartis relativo aos resultados de MTT obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico dos agentes terapêuticos Paclitaxel (Pacli) (175 mg/m <sup>2</sup> ), Gemcitabina (Gem) (1 250 mg/m <sup>2</sup> ) e Paclitaxel (175 mg/m <sup>2</sup> ) + Gemcitabina (1 250 mg/m <sup>2</sup> ). Estes foram estudados isoladamente e em combinação com diferentes concentrações de GTE po <i>MyProtein</i> <sup>®</sup> (0,5 – 5 - 10 µg/ml). ....	<b>33</b>
<b>Figura 20</b> - Gráfico de extremos e quartis relativo aos resultados de MTT dos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação da toxicidade dos agentes terapêuticos Cisplatina (Cis) (75 mg/m <sup>2</sup> ), Gemcitabina (Gem) (1 250 mg/m <sup>2</sup> ) e Cisplatina (75 mg/m <sup>2</sup> ) + Gemcitabina (1 250 mg/m <sup>2</sup> ). Estes foram analisados de forma isolada e em associação a diferentes concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>34</b>
<b>Figura 21</b> - Diagrama de extremos e quartis ilustrativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) dos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação da toxicidade dos agentes terapêuticos Ciclofosfamida (Ciclo) (600 mg/m <sup>2</sup> ), Doxorrubicina (Doxo) (60 mg/m <sup>2</sup> ), Transtuzumab (Trans) (8 mg/Kg) e Ciclofosfamida (600 mg/m <sup>2</sup> ) + Doxorrubicina (60 mg/m <sup>2</sup> ) + Transtuzumab (8 mg/Kg). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>35</b>
<b>Figura 22</b> - Gráfico de extremos e quartis representativo dos resultados de MTT relativos aos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação do efeito citotóxico dos agentes terapêuticos Docetaxel (Doce) (75 mg/m <sup>2</sup> ), Ciclofosfamida (Ciclo) (600 mg/m <sup>2</sup> ) e Docetaxel (75 mg/m <sup>2</sup> ) + Ciclofosfamida (600 mg/m <sup>2</sup> ). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>36</b>
<b>Figura 23</b> - Gráficos de extremos e quartis relativos aos resultados de MTT obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico dos agentes terapêuticos: <b>(a)</b> Docetaxel (Doce) (88 mg/m <sup>2</sup> ), Gemcitabina (Gem) (950 mg/m <sup>2</sup> ) e Docetaxel (88 mg/m <sup>2</sup> ) + Gemcitabina (950 mg/m <sup>2</sup> ); <b>(b)</b> Docetaxel (Doce) (63 mg/m <sup>2</sup> ), Gemcitabina (Gem) (1 750 mg/m <sup>2</sup> ) e Docetaxel (63 mg/m <sup>2</sup> ) + Gemcitabina (1 750 mg/m <sup>2</sup> ); Ambos foram avaliados de forma isolada e em associação às concentrações de GTE po <i>MyProtein</i> <sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>37</b>
<b>Figura 24</b> - Diagrama de extremos e quartis ilustrativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação da toxicidade dos agentes terapêuticos 5-Fluorouracilo (5-FU) (600 mg/m <sup>2</sup> ), Metotrexato (MTX) (40 mg/m <sup>2</sup> ), Ciclofosfamida (Ciclo) (600 mg/m <sup>2</sup> ) e 5-Fluorouracilo (600 mg/m <sup>2</sup> ) + Metotrexato (40 mg/m <sup>2</sup> ) + Ciclofosfamida (600 mg/m <sup>2</sup> ). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação às concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>38</b>
<b>Figura 25</b> - Gráfico de extremos e quartis representativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico do agente terapêutico Ácido Zoledrónico (4 mg/pessoa). Este foi avaliado de forma isolada e em associação às concentrações de GTE po <i>MyProtein</i> <sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml). ....	<b>39</b>

<b>Figura 26</b> - Diagrama de extremos e quartis relativo aos resultados de MTT obtidos nos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação do efeito citotóxico do agente terapêutico Denozumab (120 mg/pessoa). Este foi avaliado de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po <i>MyProtein</i> <sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml).....	<b>39</b>
<b>Figura 27</b> - Gráfico de extremos e quartis ilustrativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) dos ensaios <i>in vitro</i> (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação da toxicidade dos agentes terapêuticos: (a) Vincristina (Vin) (2 mg/m <sup>2</sup> ), Epirrubicina (Epi) (75 mg/m <sup>2</sup> ), Ciclofosfamida (Ciclo) (1 200 mg/ m <sup>2</sup> ) e Vincristina (2 mg/m <sup>2</sup> ) + Epirrubicina (75 mg/m <sup>2</sup> ) + Ciclofosfamida (1 200 mg/ m <sup>2</sup> ); (b) Vincristina (Vin) (2 mg/m <sup>2</sup> ), Doxorubicina (Doxo) (75 mg/m <sup>2</sup> ), Ciclofosfamida (Ciclo) (1 200 mg/m <sup>2</sup> ) e Vincristina (2 mg/m <sup>2</sup> ) + Doxorubicina (75 mg/m <sup>2</sup> ) + Ciclofosfamida (1 200 mg/ m <sup>2</sup> ). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po <i>MyProtein</i> <sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml).....	<b>41</b>
<b>Figura 28</b> - Registo da monitorização física do Animal 1, após a 1 <sup>a</sup> inoculação celular. ....	<b>43</b>
<b>Figura 29</b> – Variação dos valores de SUV <sub>Médio</sub> referentes às regiões de interesse definidas, ao longo do estudo, tendo sido obtidos com recurso à metodologia supraexplanada.....	<b>43</b>
<b>Figura 30</b> – Composição de imagens relativas à evolução tumoral do Animal 1, obtidas com o sistema <i>easyPET.3D</i> após a administração de [ <sup>18</sup> F]-FDG. Esta integra os cortes transversal (à esquerda), coronal (ao centro) e sagital (à direita), com 0,6 mm de espessura. O cursor verde identifica a mesma posição, em cada uma das imagens (aproximadamente o local da escarificação óssea e da inoculação celular). Ao lado é incluído o registo fotográfico da monitorização física do animal. ....	<b>44</b>
<b>Figura 31</b> – Composição de imagens de um corte sagital com 1 mm de espessura, obtidas com recurso ao sistema <i>easyPET.3D</i> após a administração de [ <sup>18</sup> F]-NaF. O cursor vermelho identifica, aproximadamente, o local da escarificação óssea no controlo negativo (sem desenvolvimento metastático), positivo (com metástases ósseas) e na última imagem adquirida do Animal 1. ....	<b>44</b>
<b>Figura 32</b> - Registo da monitorização física do Animal 2, após a 1 <sup>a</sup> inoculação celular. ....	<b>45</b>
<b>Figura 33</b> - Valores de SUV <sub>Médio</sub> obtidos, para cada uma das imagens do Animal 2 adquiridas, a partir da região de interesse definida. ....	<b>45</b>
<b>Figura 34</b> – Imagens PET relativas à evolução tumoral do Animal 2 obtidas com o sistema <i>easyPET.3D</i> após a administração de [ <sup>18</sup> F]-FDG. Estas contemplam os cortes transversal (à esquerda), coronal (ao centro) e sagital (à direita), com 0,6 mm de espessura. O cursor verde identifica a mesma posição (o local aproximado da inoculação celular), em cada uma das imagens. Ao lado é incluído o registo fotográfico relativo à monitorização física do animal. ....	<b>46</b>
<b>Figura 35</b> – Observação das preparações histológicas coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (H&E) ao microscópio ótico, onde se identificam: <b>A</b> - Cérebro; <b>B</b> - Tábua óssea interna; <b>C</b> - Tumor; <b>D</b> - Cápsula fibrosa; <b>E</b> - Osteoide; <b>F</b> - Tábua óssea externa; <b>G</b> - Aponevrose; <b>H</b> - Músculo; <b>I</b> - Pele; <b>J</b> - Epiderme; <b>K</b> – Derme (40x; 100x; 200x; 500x). ....	<b>46</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Identificação e descrição do mecanismo de ação de alguns agentes quimioterapêuticos utilizados em contexto clínico e integrados nos protocolos selecionados para os ensaios <i>in vitro</i> da presente dissertação. Note-se que alguns destes fármacos pertencem a protocolos exclusivamente direcionados ao tumor maligno da mama (i), à metastização óssea (ii) ou em ambos os cenários clínicos (iii).....	<b>12</b>
<b>Tabela 2</b> – Caracterização de alguns agentes utilizados na terapia direcionada em contexto clínico e incluídos nos protocolos selecionados para os ensaios <i>in vitro</i> da presente dissertação. Salva-se a sua inclusão em protocolos exclusivamente direcionados ao tumor maligno da mama (i) ou à metastização óssea (ii).....	<b>13</b>
<b>Tabela 3</b> - Síntese dos protocolos clínicos selecionados para os ensaios <i>in vitro</i> .....	<b>22</b>
<b>Tabela 4</b> - Descrição dos protocolos aplicados ao modelo animal de tumor primário da mama (a rosa) e ao modelo de tumor metastático da mama (a amarelo), baseados nos protocolos clínicos previamente estudados nos ensaios <i>in vitro</i> . A dosagem ajustada foi calculada com base na concentração dos fármacos cedidos pelo CHUC, bem como na massa e área estimada do animal (60 cm <sup>2</sup> ).....	<b>27</b>

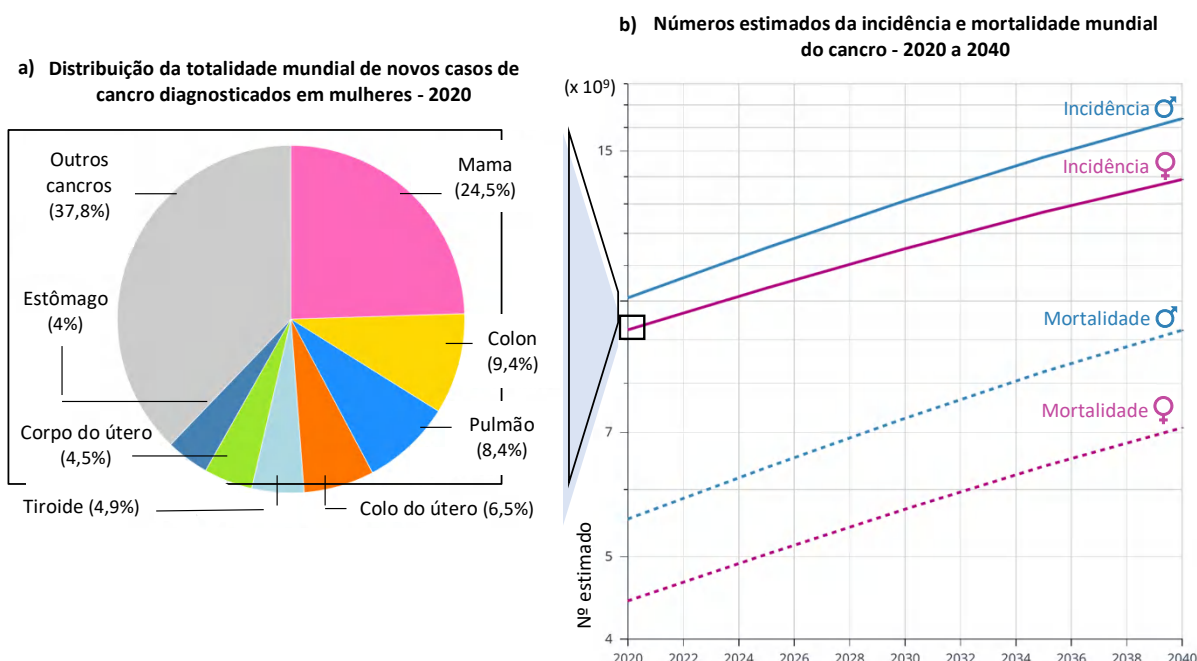
# Índice

Acrónimos e Abreviaturas .....	I
Índice de Figuras.....	III
Índice de Tabelas.....	VI
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Sinopse .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Revisão da Literatura.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Cancro – nomenclatura e desenvolvimento .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Cancro da mama .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Anatomia e fisiologia da mama.....	5
2.2.2. Classificação do cancro da mama .....	5
<b>2.3. Desenvolvimento metastático .....</b>	<b>7</b>
2.3.1. Anatomia e fisiologia do osso .....	8
2.3.2. Metastização óssea.....	8
<b>2.4. Diagnóstico .....</b>	<b>9</b>
2.4.1. PET – Princípios físicos .....	10
2.4.2. Sistemas microPET – Tecnologia <i>easyPET</i> .....	10
<b>2.5. Terapêuticas.....</b>	<b>11</b>
2.5.1. Terapêuticas sistêmicas e direcionadas.....	11
2.5.2. Extrato de chá verde .....	13
<b>3. Materiais e Metodologias.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Caracterização da linha celular .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Cultura celular .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. Meio de cultura.....	15
3.2.2. Expansão das linhas celulares e descongelação.....	17
3.2.3. Manutenção celular .....	18
3.2.4. Dissociação Celular.....	18
3.2.5. Contagem de células .....	19
<b>3.3. Ensaios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>21</b>
3.3.1. Plaqueamento celular .....	21
3.3.2. Protocolo experimental .....	21
3.3.3. Teste de viabilidade celular – MTT.....	23
<b>3.4. Ensaios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>24</b>
3.4.1. Modelo Animal.....	25
3.4.2. Estudo Imagiológico.....	28
<b>3.5. Ensaios histológicos.....</b>	<b>30</b>
<b>4. Apresentação e Discussão dos Resultados .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Ensaios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Ensaios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>5. Conclusões e perspectivas futuras.....</b>	<b>47</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>48</b>

# 1. Introdução

Atualmente, a Agência Internacional para a Investigação no Cancro (IARC) estima que, à escala global, uma em cada cinco pessoas desenvolverá cancro ao longo da sua vida, bem como que um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres não sobreviverão a esta patologia [1]. Desta forma, com um total aproximado de dezanove milhões de novos casos e dez milhões de mortes associadas estimadas em 2020, o cancro apresenta-se como um grave problema de saúde em todo o mundo (Figura 1) [2].

Segundo os dados estatísticos mais recentes (Figura 1), o tumor maligno da mama representa 24,5% do total de novos diagnósticos de cancro no sexo feminino, evidenciando-se como o mais prevalente dentro da diversidade de neoplasias malignas [2]. Adicionalmente, o desenvolvimento de doença metastática tem vindo a revelar-se muito preocupante, considerando que 20-30% dos doentes com diagnóstico de cancro da mama não sobrevive à sua disseminação no organismo [3]. Assim, a disseminação para órgãos distintos da sua origem primária tem sido predominantemente reportada nos pulmões, fígado e cérebro [3]. No entanto, é ao nível ósseo que mais de 70% dos doentes, com estádios avançados da progressão tumoral maligna da mama, desenvolvem metástases [4].



**Figura 1 - a)** Gráfico circular que integra a distribuição da totalidade mundial de novos casos de cancro diagnosticados em mulheres, no ano de 2020, de acordo com a diversidade de neoplasias. **b)** Gráfico referente aos números estimados da incidência e mortalidade associadas ao cancro, para ambos os sexos, a nível mundial. Apresentam-se os dados estatísticos mais recentes, relativos a 2020, assim como uma previsão a vinte anos para os referidos parâmetros (adaptado de [2]).

A tendência supramencionada também se verifica nos múltiplos países da Europa, sendo que, anualmente, cerca de dois milhões e seiscentas mil pessoas são diagnosticadas com cancro e um milhão e duzentas mil morrem devido à doença [2]. No que concerne ao tumor maligno da mama este mantém-se como o mais frequente na população feminina europeia, representando 25,8% do total de novos casos de cancro diagnosticados ao longo de 2020 [2]. A análise da evolução deste problema oncológico, nos doentes europeus, evidencia a manutenção da propensão preferencial para a metastização óssea, o que se traduz em sinais e sintomas, tais como: desenvolvimento de dor intensa, fraturas patológicas, hipercalcemia, mobilidade limitada e, como consequência, um aumento significativo da mortalidade [4].

Face à conjuntura descrita, o cancro é considerado a principal causa de morte na sociedade atual, pelo que justifica a mobilização de esforços e fundos das autoridades de saúde mundiais competentes, para um conjunto de domínios fundamentais: prevenção, deteção precoce, diagnóstico e tratamento [5]. Assim,

compreende-se que só o investimento nestas linhas de ação contribuirá positivamente para o controlo da patologia em questão, bem como para a melhoria da qualidade de vida dos doentes e sobreviventes de doença oncológica.

Neste contexto, o desenvolvimento da presente dissertação sustenta-se na relevância quer da investigação de terapêuticas que aliem eficácia à redução do seu efeito citotóxico, quer ao estudo de metodologias capazes de promover um diagnóstico oncológico precoce, com impacto direto na melhoria da qualidade de vida dos doentes. Neste sentido, e numa primeira fase, objetiva-se a avaliação *in vitro* do potencial adjuvante de um extrato de chá verde (*Green Tea Extract powder – MyProtein®*), quando combinado com agentes quimioterapêuticos utilizados, atualmente, em contexto clínico, para o tratamento do tumor maligno da mama e respetiva metastização óssea. Simultaneamente, é objetivo desta investigação a transposição da avaliação em questão para um modelo animal adequado. Este modelo experimental animal deve viabilizar a indução não-ortotópica de cancro da mama, assim como simular a invasão tumoral metastática no tecido ósseo. A sua monitorização será realizada através do sistema *easyPET.3D*, sendo pretensão deste trabalho a deteção de estádios muito iniciais de desenvolvimento tumoral (imagiologia molecular), para uma aplicação precoce das combinações terapêuticas em estudo.

O processamento e quantificação das imagens PET adquiridas, bem como o acompanhamento e registo de eventuais evidências externas da evolução tumoral, permitirão tecer conclusões quanto à indução tumoral no modelo animal selecionado. Adicionalmente, será possível inferir acerca da eficácia do agente adjuvante em análise e, ainda, sobre a relevância do diagnóstico precoce, que tão fulcral se tem revelado no domínio da oncologia.

## 1.1. Sinopse

A presente dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos distintos.

Em primeiro lugar, ao longo do **capítulo 1** é apresentado o âmbito desta investigação, tendo por base a análise dos dados epidemiológicos relativos à temática do cancro, mais recentemente divulgados pela Organização Mundial de Saúde. Simultaneamente, encontram-se sistematizados os principais objetivos orientadores e motivadores deste trabalho.

O **capítulo 2** dá lugar à contextualização da temática em estudo, pelo que integra a revisão de conceitos fundamentais à compreensão do trabalho desenvolvido, bem como a síntese geral do conhecimento científico já reportado na literatura da área.

O **capítulo 3** descreve, detalhadamente, todos os protocolos laboratoriais adotados e que servem de base à realização dos vários ensaios *in vitro*, *in vivo*, imagiológicos e histológicos.

No que concerne ao **capítulo 4**, este reporta todos os resultados obtidos, relativos a cada um dos ensaios executados, assim como a sua respetiva discussão e interpretação.

Por último, o **capítulo 5** alia as conclusões tecidas, para cada uma das hipóteses em estudo, à descrição das perspetivas futuras de investigação complementar à presente dissertação.



## 2. Revisão da Literatura

O capítulo que se inicia tem como objetivo a distinção de conceitos e a descrição de aspetos fundamentais à compreensão do trabalho desenvolvido ao longo da presente dissertação. Para tal, tendo como suporte a consulta de trabalhos reportados na literatura da área, serão abordados os processos carcinogénico e metastático (com particular destaque para a ocorrência primária na mama e consequente metastização óssea), bem como as características fundamentais da ação farmacológica das combinações terapêuticas em estudo. Simultaneamente, será apresentada a síntese dos princípios físicos fundamentais ao funcionamento do sistema inovador de aquisição de imagem *easyPET.3D*.

### 2.1. Cancro – nomenclatura e desenvolvimento

Considerando o conflito de nomenclatura que surge frequentemente associado à temática em estudo, torna-se relevante, em primeiro lugar, a distinção de dois termos fundamentais: tumor e cancro.

O desenvolvimento tumoral traduz o crescimento e proliferação anormal de células, decorrente, nomeadamente, de disfunções nos mecanismos reguladores do desenvolvimento celular [6]. Esta reprodução descontrolada e persistente das células resulta na sua acumulação e no consequente aumento do tecido numa determinada região. A massa anormal desenvolvida detém a designação de tumor ou neoplasia que, por sua vez, pode ser classificada como benigna ou maligna [7]. Neste sentido, se uma neoplasia permanece limitada à sua região de origem, apresentando unicamente crescimento em volume, é definida como neoplasia ou tumor benigno [8]. De forma distinta, um tumor maligno caracteriza-se pela sua capacidade de invadir tecidos saudáveis e órgãos adjacentes, bem como pela possibilidade de disseminação, através de vasos sanguíneos e linfáticos, para regiões distantes do seu local de desenvolvimento primário – metastização [8].

Desta forma, a palavra cancro refere-se a uma neoplasia maligna, descrevendo um vasto espectro de doenças que se desenvolvem ao longo do tempo e cuja origem está relacionada com a divisão e crescimento anormal das células, devido a mutações ou alterações nos genes responsáveis pela sua regulação [9]. O cancro distingue-se, assim, pela capacidade de ultrapassar barreiras naturais e induzir desenvolvimento metastático.

O processo através do qual as células saudáveis se transformam em células cancerígenas é designado carcinogénese. Este processo, cuja origem está diretamente relacionada com a influência de fatores físicos, químicos, biológicos e/ou genéticos, pode ser conceptualmente dividido em quatro etapas distintas: iniciação, promoção, conversão maligna e progressão [10].

A iniciação tumoral compreende a exposição das células normais a agentes carcinogénicos, os quais induzem a ativação de oncogenes<sup>1</sup> e/ou a inativação de genes supressores tumorais<sup>2</sup>. Desta forma, após a ocorrência de uma mutação celular inicial, as células podem permanecer estacionárias no estado de iniciação durante vários anos [10].

No que concerne à promoção tumoral, esta integra a expansão clonal seletiva das células que se encontram no estado de iniciação, envolvendo a indução de um estado de hiperplasia, inflamação crónica e stress oxidativo [10]. Os promotores tumorais, que podem apresentar especificidade para um determinado tecido, incluem a exposição a agentes químicos, à radiação ultravioleta, infeção e inflamação, fatores de crescimento endógenos e citocinas [11]. Desta forma, as vias de indução tumoral e a regulação da sua expressão génica resultam, para além da proliferação de células mutadas, no estímulo da angiogénese, no recrutamento de células inflamatórias e no aumento da sobrevivência celular (por inibição da apoptose) [11]. Assim, formam-se tumores visíveis, geralmente lesões benignas ou conjuntos de células pré-neoplásicas, que podem adquirir malignidade através da sua conversão em células que expressam o fenótipo maligno [10].

A progressão tumoral corresponde à última fase do processo carcinogénico, verificando-se que as células cancerígenas apresentam vantagem seletiva, relativamente às células saudáveis, já que conseguem proliferar em ambientes desfavoráveis. Neste sentido, ocorre a proliferação das células tumorais,

---

<sup>1</sup> Oncogene – forma mutada de um proto-oncogene (implicado no controlo do normal crescimento e divisão celular), codificando versões alteradas ou uma quantidade excessiva de proteínas envolvidas nas vias de crescimento celular.

<sup>2</sup> Genes supressores tumorais – controlam o crescimento e divisão celulares, podendo a sua inativação viabilizar a indução tumoral.

demonstrando-se que, à medida que o tumor amplia as suas dimensões, as células adquirem mutações adicionais, conduzindo ao aumento da sua heterogeneidade [10]. Este comportamento representa um dos maiores entraves ao seu tratamento precoce e eficaz.

## 2.2. Cancro da mama

O cancro da mama é uma doença maligna com origem no crescimento descontrolado de células mamárias com características anormais. Os mecanismos exatos associados à sua génese ainda não são totalmente conhecidos, apesar do esforço científico realizado para se obter a sua caracterização molecular e prever a respetiva progressão [12].

Atualmente, têm sido explorados, pela comunidade científica, vários modelos que procuram explicar a fisiopatologia do tumor maligno da mama. Ao nível da célula de origem, o modelo de evolução clonal sustenta-se na acumulação de mutações sucessivas, em virtude da ocorrência de alterações epigenéticas profícuas nas células tumorais. Estas conferem-lhes vantagem seletiva e torna-as mais capazes de crescer e proliferar em ambientes condicionados (redução dos níveis de oxigénio, escassez de nutrientes e condicionamento do crescimento por parte dos tecidos saudáveis circundantes). Por outro lado, o modelo das células-tronco cancerígenas considera que apenas as células tumorais malignas precursoras iniciam e sustentam a progressão tumoral [12]. Aos níveis morfológico e molecular, a acumulação de alterações genéticas e a evolução das células cancerígenas, segundo duas vias de progressão molecular divergentes (relacionadas com a expressão dos recetores de estrogénio, grau e proliferação tumoral), procuram, respetivamente, justificar a origem do cancro da mama [12].

No que concerne às alterações moleculares, as células cancerígenas caracterizam-se pela presença frequente de mutações ou pela amplificação de genes, de entre as quais se destaca, em 41% dos tumores, a repressão do gene *TP53* – o “guardião do genoma”. Este codifica um mecanismo de supressão do crescimento celular descontrolado, através da paragem do ciclo celular, ativação da reparação do DNA e regulação da apoptose [12]. Neste mesmo sentido, mutações, nomeadamente, nos genes *FGFR2* (codifica o recetor 2 do fator de crescimento dos fibroblastos), *CASP8* (traduz a proteína caspase-8) e *TGFB1* (codifica o fator de crescimento beta 1), conduzem à sua repressão ou ativação e, por conseguinte, promovem o processo carcinogénico na mama [13].

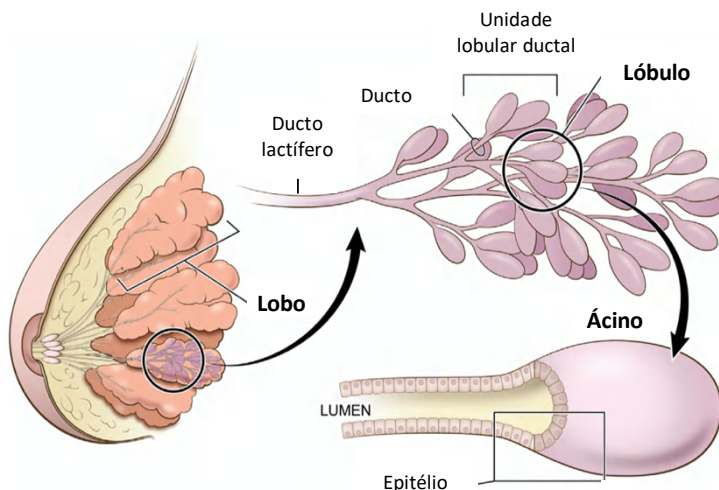
Por outro lado, a exposição hormonal foi identificada como determinante para o desenvolvimento do tumor maligno da mama. Considerem-se, neste contexto, os desequilíbrios de estrogénio e progesterona, característicos dos ciclos menstruais, que, ao potenciarem a proliferação celular, podem estar na origem da acumulação de alterações ao nível das sequências de DNA. Tendo em conta a frequência de cada ciclo, e dada a necessidade de se ativarem repetidas vezes mecanismos de reparação do DNA, estes podem, por vezes, executar uma reparação incorreta, dando origem a células pré-neoplásicas e/ou malignas [12].

Adicionalmente, ao longo dos últimos anos, a investigação científica na área da oncologia muito se tem focado na identificação de potenciais fatores de risco para o desenvolvimento do cancro, dada a sua importância numa das principais áreas de atuação no combate a esta patologia: a prevenção. Como tal, e no que concerne ao tumor maligno da mama, são múltiplos os fatores ambientais e associados à dinâmica do quotidiano (fatores de risco modificáveis) que, em combinação, podem justificar a sua origem. No entanto, o histórico familiar e a predisposição genética (fatores de risco não-modificáveis) assumem especial relevância, considerando as taxas de ocorrência que lhes estão associadas. Assim, mutações autossómicas dominantes nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* (genes de suscetibilidade ao cancro da mama 1 e 2) traduzem a síntese de proteínas disfuncionais, conduzindo à inibição de mecanismos biológicos fundamentais e à disseminação de células tumorais [13].

Vários estudos demonstraram, ainda, que o cancro da mama não se restringe apenas à acumulação de células tumorais malignas, já que integra alterações significativas no estroma circundante - microambiente tumoral [14]. Este caracteriza-se pela presença de células do sistema imunitário, células estromais molecularmente alteradas e com vias de sinalização disfuncionais, bem como por uma matriz extracelular modificada, a qual fornece suporte mecânico à progressão tumoral [14]. Atualmente, estas alterações são reconhecidas como um elemento crítico para o desenvolvimento do cancro da mama e do processo metastático, motivo pelo qual se encontram em estudo como potenciais alvos terapêuticos [14].

### 2.2.1. Anatomia e fisiologia da mama

Para uma melhor compreensão das secções subsequentes, torna-se fundamental a apresentação de uma breve caracterização anatomofisiológica da mama feminina. Esta pode ser definida como uma estrutura glandular par, situada na parede anterior e superior do tórax, na espessura do tecido celular subcutâneo [15]. O seu desenvolvimento tem início na puberdade, altura em que ocorrem alterações morfológicas e funcionais significativas nestas estruturas, em resultado da influência das normais variações dos padrões hormonais [16]. Após o *terminus* deste conjunto de transformações, a descrição da constituição anatómica da mama (**Figura 2**) integra o tecido glandular epitelial (parênquima), o tecido celuloadiposo e o tecido fibroso, o qual atravessa e rodeia o parênquima mamário [17].



**Figura 2** – Estrutura anatómica da mama (adaptada de [17]).

O tecido glandular é constituído por 12-20 lobos, incorporando cada um deles um conjunto de 20-40 lóbulos, os quais se subdividem, por sua vez, em estruturas de menores dimensões: os ácinos [15]. Cada um dos lobos detém um canal excretor próprio - ducto lactífero - que se dirige para a base da papila, de forma independente. Por outro lado, o tecido celuloadiposo reveste totalmente a glândula mamária, conferindo-lhe proteção. É de notar que este tecido é caracterizado pela sensibilidade a variações hormonais menstruais, bem como pela presença da enzima aromatase [18]. Esta é a principal responsável pela

produção de estradiol, a partir de uma molécula precursora: o colesterol. Desta forma, considerando que a presença de adipócitos na estrutura mamária aumenta com a idade, é compreensível que em mulheres em idade pós-menopausa a quantidade de estradiol nesta região seja maior, comparativamente com a dos níveis plasmáticos. Como tal, atendendo à existência de tumores positivos para os recetores de estrogénio, os quais serão devidamente abordados na subsecção seguinte, identifica-se uma grande probabilidade de este facto estar na origem da maior incidência de tumor maligno da mama em mulheres com idade mais avançada [18]. Quanto ao tecido conjuntivo fibroso, atendendo à sua conformação, este garante estrutura e sustentação aos lobos e canais lactíferos [15].

A drenagem linfática assume uma importância demarcada na anatomia da mama. Assim, a linfa abandona a mama através de vasos principais e acessórios, drenando para gânglios axilares, subclaviculares, torácicos internos, frénicos inferiores e interpeitorais [15]. No entanto, cerca de 75% de toda a drenagem linfática é realizada para os linfonodos axilares e a restante percentagem principalmente para linfonodos torácicos internos, razão pela qual estes são os gânglios preferenciais para a disseminação tumoral [16]. Neste sentido, entende-se que o sistema linfático é a principal via metastática do tumor maligno da mama, daí a enorme relevância do estudo do gânglio sentinela – o primeiro gânglio que drena diretamente a linfa da área do carcinoma mamário e no qual primeiro ficam aprisionadas células malignas [18].

No que diz respeito à sua fisiologia, sustentada na constituição anatómica supradescrita, a mama feminina tem como função primordial a lactação: termo que engloba a síntese, secreção e ejeção de leite para alimentar o recém-nascido (mamíferos) [16]. O desenvolvimento da função mamária é garantido pelo estrogénio (estradiol) que induz a ramificação do sistema ductal e a maturação dos mamilos. Adicionalmente, no tecido mamário estão presentes fatores parácrinos que influenciam a divisão e diferenciação celular [16].

### 2.2.2. Classificação do cancro da mama

O tumor maligno da mama é considerado, de forma unânime, uma doença com um elevado grau de heterogeneidade, segundo diferentes pontos de vista. Neste sentido, esta patologia apresenta características

histopatológicas e biológicas variáveis, o que determina respostas diversas às terapêuticas sistêmicas, bem como desfechos clínicos distintos. Desta forma, surgiu a necessidade de se estabelecer uma classificação científica adequada, clinicamente útil, facilmente aplicável e amplamente reprodutível. É neste contexto que surge a classificação do cancro da mama, segundo o tipo de células de origem, o grau de invasão dos tecidos e o estágio da doença (Figura 3), bem como segundo as suas características moleculares intrínsecas [19].

No que concerne às células de origem e que, por conseguinte, constituem a massa tumoral maligna, é possível a distinção entre **carcinoma** – ocorre nas células epiteliais que revestem os ductos e lobos da glândula – e **sarcoma** – representativo de menos de 1% dos cancros da mama, encontrando-se associado ao estroma mamário [13].

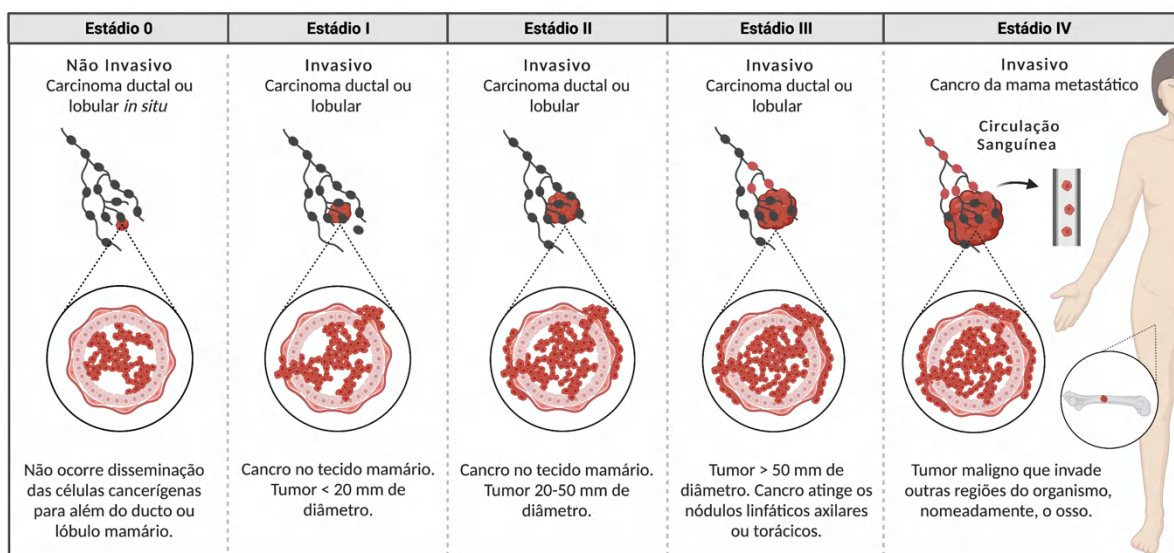


Figura 3 – Classificação do cancro da mama quanto às suas características moleculares intrínsecas (adaptado de [19]).

O estudo dos perfis de expressão génica evidenciou um conjunto de genes intrínsecos, relacionados com a expressão de recetores: de estrogénio (ER), de progesterona (PR) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), capazes de diferenciar os vários subtipos de tumor maligno da mama [20].

Assim, é de notar que, a mama sem patologia é caracterizada pela presença de células cuja membrana plasmática possui recetores (proteínas/glicoproteínas), os quais se ligam especificamente a substâncias químicas, designadas por moléculas sinalizadoras. Frequentemente, as moléculas em questão correspondem às hormonas estrogénio e progesterona, as quais são, desta forma, capazes de controlar o comportamento celular. Quer isto dizer que, mediante a presença destes mesmos recetores nas células cancerígenas, elas podem apresentar sensibilidade ao estrogénio e/ou à progesterona, impulsionando o seu crescimento. O mesmo acontece para o HER2, que, ao encontrar-se sobreexpresso nas células tumorais malignas da mama, conduz à sua proliferação e divisão descontroladas.

Neste sentido, quanto às suas características moleculares intrínsecas, surgem as seguintes classificações referentes à neoplasia maligna da mama:

- ⇒ **Luminal A:** representa cerca de 40% dos cancros da mama, apresentando ER e/ou PR. No entanto, não sobreexpressa a proteína HER2 e apresenta baixos níveis de Ki-67 (proteína presente nas células em divisão, permitindo avaliar o crescimento do tumor). Estes tumores malignos exibem um padrão de crescimento lento e um prognóstico positivo [20];
- ⇒ **Luminal B:** traduz menos de 20% dos tumores malignos da mama diagnosticados, sendo positivo para os ER e/ou PR. De notar que podem ou não sobreexpressar HER2, distinguindo-se do subtipo anterior pelos elevados níveis de Ki-67, pelo que estão associados a um prognóstico ligeiramente mais preocupante [20];
- ⇒ **Enriquecido em HER2:** inclui 10% a 15% das neoplasias malignas da mama, não apresentando ER nem PR. Este subtipo caracteriza-se, simultaneamente, pela acentuada presença de HER2, o que poderá justificar o seu rápido crescimento [20];

- ⇒ **Basal-like:** ilustra 20% do total de cânceros da mama diagnosticados, sendo negativo para ER, PR e HER2. Este subtipo distingue-se dos supramencionados pela elevada malignidade e agressividade. Desta forma, este tumor maligno não é sensível à influência hormonal, incidindo, particularmente, em mulheres com mutações nos genes de suscetibilidade ao cancro da mama 1 (BRCA1) e 2 (BRCA2) ou com idade inferior a 40 anos [20];
- ⇒ **Normal-like:** o presente subtipo é semelhante à doença Luminal A, estando associado, contudo, a um prognóstico menos positivo. Apresenta ER e/ou PR, bem como baixos níveis de Ki-67, sendo negativo para HER2 [20].

### 2.3. Desenvolvimento metastático

O processo de metastização está associado ao crescimento e à proliferação de células cancerígenas em órgãos distintos do seu local de origem, após a sua libertação a partir do tumor maligno primário. As células que estão na génese deste desenvolvimento metastático são definidas como células tumorais disseminadas, sendo fundamentais para a definição de malignidade, tal como já referido. Desta forma, ocorre a progressão de um tumor maligno localizado para uma doença sistémica, através de um conjunto de mecanismos que integram a designada cascata metastática (Figura 4) [3].

A primeira etapa que constitui esta cascata está associada à capacidade das células cancerígenas se desintegrarem do tumor primário, podendo ser explicada à luz de dois modelos de disseminação metastática distintos: o modelo linear e o modelo paralelo [3]. O primeiro modelo considera que apenas as neoplasias malignas que se encontram num estado mais avançado detêm alterações moleculares suficientes para a progressão da cascata. Por outro lado, o modelo paralelo defende que a disseminação metastática pode ocorrer numa altura precoce do processo carcinogénico [3]. Desta forma, embora sejam necessários mais dados para a definição de um padrão de disseminação temporal das células tumorais, a maioria das neoplasias malignas sugere o desenvolvimento metastático, apesar de não detetado, no momento do diagnóstico [3]. A segunda etapa da cascata metastática refere-se à capacidade de as células tumorais disseminadas invadirem tecidos adjacentes, ocorrendo a degradação da membrana basal e a remodelação da matriz extracelular [3]. Posteriormente, a entrada das células tumorais no lúmen dos vasos sanguíneos ou linfáticos define o início da terceira fase da sequência de eventos, característica do processo de metastização [3]. Uma vez na corrente sanguínea, as células tumorais passam a designar-se células tumorais circulantes, podendo permanecer em circulação como células unitárias ou em aglomerados. A transposição destas células para a formação do nicho pré-metastático no órgão-alvo marca o início da quarta fase do processo em estudo [3]. Por último, a quinta etapa diz respeito à colonização do local secundário de desenvolvimento tumoral, pelas células cancerígenas disseminadas [3,21].

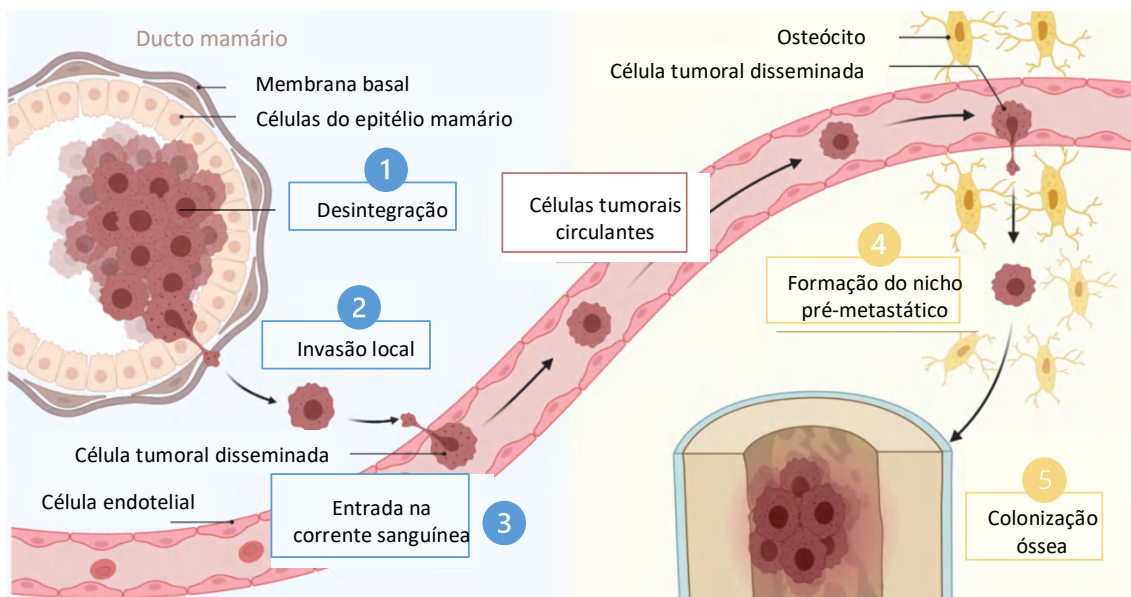


Figura 4 – Progressão tumoral e etapas da cascata de metastização (adaptado de [21]).

À semelhança de outros tumores malignos, o cancro da mama exhibe um padrão de disseminação específico, ocorrendo preferencialmente no tecido ósseo, tal como explorado ao longo do primeiro capítulo da presente dissertação. Apesar desta tendência, o mecanismo molecular que lhe está associado ainda não foi totalmente elucidado. Stephen Paget apresentou uma das várias hipóteses a considerar, a teoria “*seed and soil*”, segundo a qual o microambiente do órgão para o qual as células cancerígenas metastizam, neste caso o osso, detém um papel fundamental no seu desenvolvimento, funcionando como um solo fértil [22].

### 2.3.1. Anatomia e fisiologia do osso

Antes de serem sintetizados os aspetos fundamentais das alterações bioquímicas induzidas pelo desenvolvimento metastático no osso, é fulcral a compreensão da morfologia e fisiologia do tecido ósseo.

Em cada um dos ossos do corpo humano é possível distinguir uma camada externa e compacta, designada por osso compacto ou cortical. Na sua espessura, de dimensão variável, identificam-se unidades

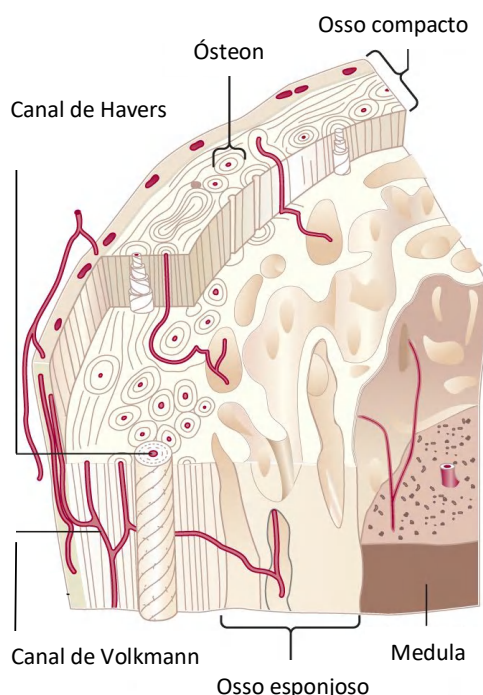


Figura 5 – Morfologia do osso (adaptado de [23]).

estruturais – o osteon [22]. Este é constituído pelo sistema de Havers, o qual é formado por substâncias inorgânicas, dispostas em anéis concêntricos, e atravessado por um canal central - canal de Havers - que, por sua vez, integra vasos sanguíneos e linfáticos, bem como fibras nervosas. Adicionalmente, a existência de canais transversais constituídos por capilares sanguíneos - canais de Volkmann - complementa a vascularização da estrutura óssea [22].

Por outro lado, envolvido pelo tecido ósseo compacto, encontra-se o tecido ósseo esponjoso, organizado segundo um sistema trabecular, que delimita pequenas cavidades – as lacunas, preenchidas por medula óssea (Figura 5) [23]. É de notar que, no osso maduro, as trabéculas apresentam um padrão de organização paralelo às linhas de maior força de compressão ou tração, garantindo a máxima rigidez.

Microscopicamente, o osso consiste numa forma especializada de tecido conjuntivo, cuja matriz extracelular é mineralizada e constituída por fibras de colagénio e fosfato de cálcio, conferindo suporte aos cristais de hidroxiapatite. Simultaneamente, é possível a identificação de quatro formas celulares características do tecido ósseo: os osteoclastos, os osteoclastos, os osteócitos e ainda as células osteogénicas [23]. De entre as células referidas, destacam-se os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz

óssea, e os osteoclastos, cuja função se prende com a reabsorção óssea, dissolvendo e degradando a matriz [23]. Assim sendo, verifica-se a homeostase da remodelação óssea, sustentada no equilíbrio constante entre as atividades osteoclástica e osteoblástica.

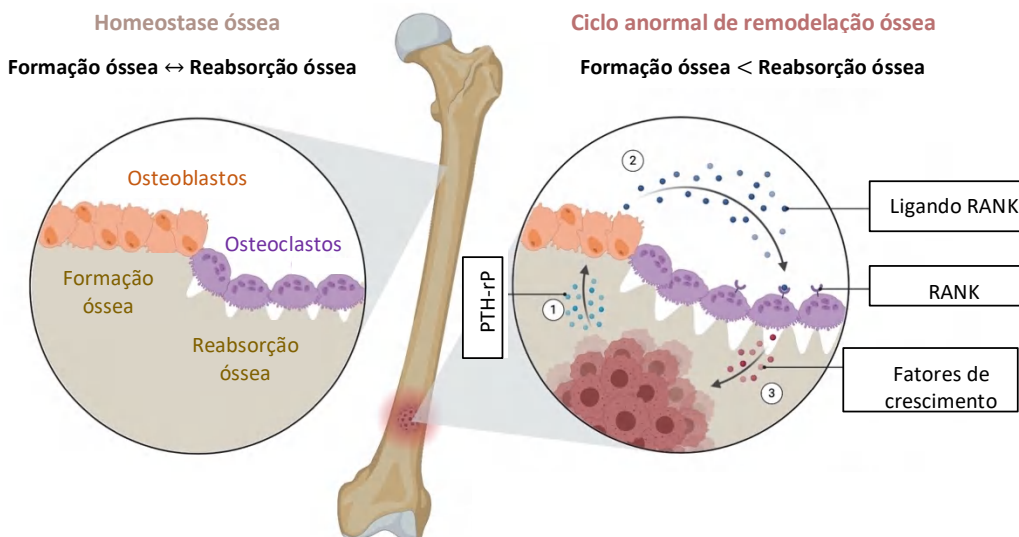
### 2.3.2. Metastização óssea

Tendo por base a conclusão da quinta etapa da cascata metastática (2.1.2), e uma vez no tecido ósseo, as células tumorais malignas interrompem a homeostase da remodelação óssea. Desta forma, e considerando as características do osso, exploradas na subsecção anterior, é possível a distinção de duas lesões: as osteolíticas - associadas à destruição do osso, sendo as mais frequentes - e as osteoblásticas - caracterizadas pelo aumento da formação óssea [22].

No que concerne ao desequilíbrio causado pelas células cancerígenas, este sustenta-se na regulação positiva do péptido relacionado com a hormona paratiróide (PTH-rP) - uma citocina osteotrópica que também regula positivamente o ativador do recetor para o ligando nuclear kappa-b (RANK) [21]. É de notar que a ligação do ligando ao RANK corresponde a um fator determinante na promoção da diferenciação e ativação da função osteoclástica. Neste sentido, esta regulação conduz à degradação da matriz óssea, o que se traduz

num conjunto de sintomas característicos do doente com diagnóstico de metástases ósseas: dor intensa, fraturas patológicas, síndromes de compressão nervosa e hipercalcemia [22].

Adicionalmente, como resultado da atividade osteoclástica aumentada, verifica-se a contínua libertação do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) - uma proteína que controla e regula a diferenciação e proliferação celulares - e de cálcio [21]. Assim, ocorre o constante crescimento das células tumorais malignas, que contribui para o estabelecimento deste ciclo anormal de remodelação óssea, ilustrado pela **Figura 6**.



**Figura 6** – Ilustração da alteração da homeostase da remodelação óssea, induzida pelo desenvolvimento metastático (adaptado de [21]).

## 2.4. Diagnóstico

Ao longo dos últimos anos, o diagnóstico precoce tem-se revelado um fator determinante para um prognóstico favorável, ao tornar possível a identificação de estádios iniciais do desenvolvimento de células cancerígenas. Desta forma, vários estudos sugerem que, à semelhança de outros tumores malignos, a deteção precoce do cancro da mama, aliada a uma terapêutica adequada, é capaz de melhorar a qualidade de vida do doente e de reduzir, significativamente, as taxas de mortalidade que lhe estão associadas [24].

Atualmente, o diagnóstico do tumor maligno da mama assenta em 3 modalidades distintas, nomeadamente: os exames clínico, imagiológico e histopatológico. Como tal, considerando os objetivos definidos para o desenvolvimento da presente dissertação, torna-se relevante uma abordagem mais direcionada às tecnologias de aquisição de imagem. Assim, na vasta área da imagiologia clínica incluem-se as mamografias convencional e digital. A mamografia é a atual técnica de rastreio padrão desta patologia, já que, a partir da emissão de raios-X, se pode avaliar a estrutura interna da mama. No entanto, algumas das suas desvantagens passam pela exposição à radiação ionizante, a desadequação a doentes com tecido mamário denso, bem como elevadas taxas de falsos-negativos e de falsos-positivos [24]. Neste sentido, a ressonância magnética (MRI) apresenta-se como uma técnica complementar capaz de fornecer resultados mais precisos e com claros benefícios para o doente, mais concretamente para os casos de elevado risco (presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*) [18].

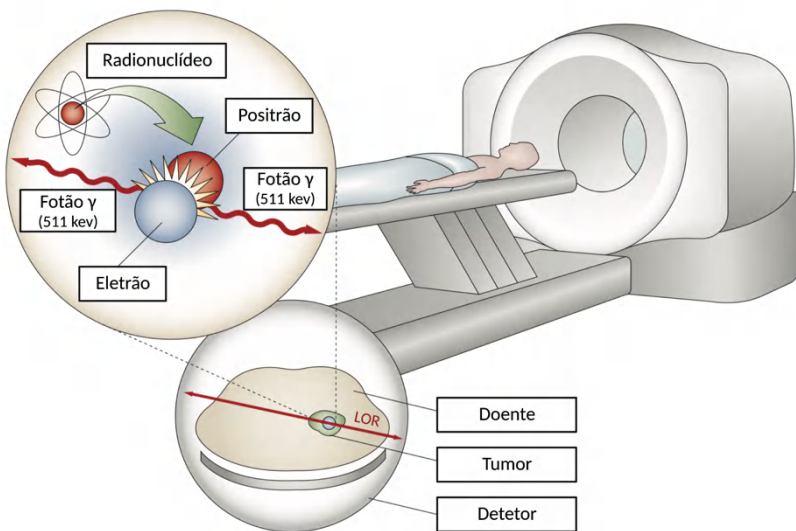
Por outro lado, destacam-se as técnicas de imagem molecular, fundamentais em Oncologia, já que são capazes de identificar as alterações metabólicas características das células cancerígenas. Estas modificações têm lugar muito antes de se poderem observar variações estruturais, nomeadamente em volume, que, na generalidade, são as que permitem o diagnóstico através dos métodos convencionais [18]. Neste contexto, destacam-se a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de positrões (PET). A PET será explorada, de forma mais detalhada, na subsecção seguinte, dados os contornos associados ao presente trabalho de investigação.

### 2.4.1. PET – Princípios físicos

A tecnologia PET pode ser definida como uma técnica de imagem minimamente invasiva em Medicina Nuclear, que permite a avaliação qualitativa e quantitativa de parâmetros fisiológicos *in vivo*, através da administração de compostos radioativos - radiofármacos (3.4.2.1) - e a análise da sua distribuição espacial no organismo [25]. Desta forma, o princípio físico que está na base do seu funcionamento é designado por decaimento radioativo de isótopos instáveis.

Aquisição da imagem PET sustenta-se, em primeiro lugar, na emissão de um positrão a partir dos radionuclídeos que integram o radiofármaco administrado ao doente [26]. Uma vez libertado, o positrão percorre uma curta distância (1 a 2 mm), perdendo energia cinética. Quando se encontra num estado próximo do repouso, este interage com um eletrão livre do meio – a sua antipartícula, já que apresenta semelhanças em todos os aspetos, à exceção da carga [26]. Desta interação, definida como fenómeno de aniquilação, resulta a conversão e a libertação de energia segundo 2 fotões gama. Dada a conservação do momento e da massa (1ª lei da termodinâmica e Princípio de Conservação da Massa e Energia de Einstein) os fotões apresentam a mesma energia (511 keV), a mesma direção, mas sentidos opostos (Figura 7) [27].

Os 2 fotões de 511 keV, emitidos com um ângulo de 180°, são detetados, em coincidência, por dois dos sensores do anel de detetores que constitui o *scanner* PET [26]. Sempre que estes fotões forem detetados na mesma janela temporal, o fenómeno é definido como uma coincidência verdadeira, definindo-se a linha de resposta (LOR). Esta une os dois pontos de interação e inclui o ponto onde teve lugar o fenómeno de



**Figura 7** – Representação do *scanner* PET convencional e dos princípios físicos que servem de base ao seu funcionamento (adaptado de [27]).

aniquilação e, por conseguinte, a emissão da radiação. Note-se que os detetores em questão, constituídos por um material cintilador cristalino, funcionam como meio de interação, produzindo luz visível após serem excitados pelos fotões gama. A luz visível produzida, proporcional à energia depositada no cintilador, é convertida em corrente elétrica, por fotomultiplicadores. Como tal, gera-se um pulso de corrente robusto que pode ser detetado e processado, com recurso a uma eletrónica padrão, obtendo-se a imagem molecular pretendida [28].

Assim, o sistema PET, apesar de não integrar o conjunto de exames de primeira linha para o diagnóstico da neoplasia maligna da mama, tem demonstrado resultados promissores no seu prognóstico e monitorização da resposta à terapia definida [29]. Para além disto, este sistema pode fornecer informações complementares às obtidas pelos métodos convencionais, nomeadamente na identificação do gânglio sentinela (2.1.1.1). Destaca-se, ainda, que a PET apresenta um enorme potencial na avaliação do desenvolvimento metastático, particularmente, quando associada a sistemas de aquisição de imagem morfológica (PET-CT), fundamentais à determinação anatómica das alterações moleculares identificadas [29]. Neste contexto, salienta-se o diagnóstico da metastização óssea, dada a existência de marcadores específicos para a alteração da homeostase óssea, característica desta patologia, o [ $^{18}\text{F}$ ]-NaF (3.4.2.1).

### 2.4.2. Sistemas microPET – Tecnologia *easyPET*

Atualmente, os modelos animais têm demonstrado uma particular relevância, nomeadamente, em estudos de biodistribuição de novos fármacos e de agentes terapêuticos, bem como na análise do desenvolvimento de diferentes patologias ao longo do tempo [30]. Desta forma, a necessidade de



monitorização destes animais para a progressão da investigação biomédica conduziu ao crescimento das técnicas de imagem pré-clínica. Estas, para além de permitirem o estudo dos modelos animais como “um todo” e de uma forma longitudinal, viabilizou a redução do número de animais necessários em cada projeto de investigação, cumprindo um dos pressupostos do Princípio dos 3R’s e melhorando a qualidade estatística dos dados adquiridos.

Assim, apesar de cada uma das distintas modalidades de imagem pré-clínica apresentar as suas vantagens, os sistemas micro-PET destacam-se pela sua tradutibilidade para o contexto clínico [30]. Quer isto dizer que, à semelhança das características mencionadas na subsecção anterior (relativas à aquisição de imagens PET), os sistemas micro-PET também são capazes de fornecer uma medida quantitativa da distribuição tridimensional de um radiofármaco administrado ao animal, de uma forma minimamente invasiva [31]. No entanto, o recurso a esta tecnologia pode, muitas vezes, ser condicionado quer pela dificuldade no acesso a radiofármacos, quer pelo elevado investimento que lhe está associado [32].

Neste contexto, foi desenvolvido, na Universidade de Aveiro, o sistema *easyPET.3D*. Esta é uma tecnologia inovadora de aquisição imagens PET, que utiliza um único par de detetores colineares, e um mecanismo de rotação inteligente com dois graus de liberdade, garantindo a total cobertura do campo de visão (FOV) [33]. Assim, o sistema *easyPET.3D*, utilizado no desenvolvimento da presente dissertação, distingue-se dos sistemas pré-clínicos convencionais pelo diferente método de aquisição, mas sobretudo pela sua redução de custos e simplicidade, garantindo um elevado desempenho, nomeadamente no que diz respeito à resolução em posição do sistema [33].

## 2.5. Terapêuticas

A atual classificação do tumor maligno da mama sustenta a definição dos vários perfis de risco e a metodologia de tratamento mais adequada a cada doente. Desta forma, distinguem-se diferentes abordagens terapêuticas: as locais e as sistémicas. O tratamento local é direcionado ao tumor maligno da mama não-metastático e inclui estratégias como a remoção cirúrgica e a possível adoção de protocolos de radioterapia pós-operatórios [34]. Por outro lado, as terapêuticas sistémicas, que podem ser classificadas como neoadjuvantes (aplicadas pré-cirurgia) ou adjuvantes (realizadas pós- cirurgia), consistem na definição de protocolos de quimioterapia ou terapia direcionada consoante as características moleculares intrínsecas do tumor, bem como mediante a identificação do desenvolvimento metastático [34].

### 2.5.1. Terapêuticas sistémicas e direcionadas

Considerando os objetivos da presente dissertação, esta secção apresenta uma abordagem concreta das terapêuticas sistémicas e direcionadas. Assim, é realizada uma breve descrição do mecanismo de ação de alguns agentes terapêuticos utilizados em contexto clínico, no tratamento do cancro da mama e da sua forma metastática, concretamente daqueles que integram os protocolos considerados nos ensaios *in vitro* desta investigação (Tabelas 1 e 2).

É de notar que a quimioterapia - principal terapêutica sistémica - tem como objetivo primordial a inibição da proliferação celular e da progressão tumoral, evitando a invasão de tecidos circundantes pelas células cancerígenas e o desenvolvimento metastático [35]. A sua ação tem lugar a diferentes níveis no interior da célula, bem como no microambiente tumoral, cuja importância foi previamente elucidada.

Por outro lado, as terapêuticas direcionadas distinguem-se por apresentarem como alvo características específicas das diferentes células neoplásicas malignas, das quais são exemplo as proteínas específicas existentes na superfície das células em questão, sendo responsáveis pela sinalização do seu crescimento e proliferação [35]. Assim, estas terapêuticas são reportadas na literatura como sendo menos suscetíveis de induzir dano nas células saudáveis.

Destaca-se, ainda, que a literatura da área reporta o recurso a fármacos de ação complementar a estas terapêuticas. Exemplo desta abordagem, concretamente em cenários de metastização óssea, é o Ácido Zoledrónico, motivo pelo qual integrou os ensaios *in vitro* da presente dissertação. Este é um agente terapêutico definido como bifosfonato, o qual é capaz de reduzir a função osteoclástica, prevenindo a reabsorção óssea. A sua ação deve-se ao azoto existente na sua constituição e ao facto de este se conseguir associar à hidroxiapatite, induzindo a acidificação do citoplasma dos osteoclastos [36].

**Tabela 1** – Identificação e descrição do mecanismo de ação de alguns agentes quimioterapêuticos utilizados em contexto clínico e integrados nos protocolos selecionados para os ensaios *in vitro* da presente dissertação. Note-se que alguns destes fármacos pertencem a protocolos exclusivamente direcionados ao tumor maligno da mama (i), à metastização óssea (ii) ou em ambos os cenários clínicos (iii).

Classe	Agente quimioterapêutico	Mecanismo de ação
Taxanos	Docetaxel <sup>i)</sup>	Este agente altera o crescimento dos microtúbulos e promove a sua estabilização (pela da inibição da despolimerização). Desta forma, impede a reorganização dinâmica da rede de microtúbulos, a qual é essencial para a fase mitótica e para a interfase do ciclo celular, que é bloqueado nas respetivas fases G2/S [37].
	Paclitaxel <sup>i)</sup>	Exibe o mesmo mecanismo de ação do Docetaxel, sendo adicionalmente capaz de induzir a apoptose celular através da ligação a proteínas Bcl-2 (responsáveis pelo controlo deste mecanismo) [38].
Antimetabolitos	Gemcitabina <sup>i)</sup>	Corresponde a um pro-fármaco que, após ser incorporado nas células cancerígenas, é transformado na sua forma ativa – nucleosídeos. Estes, ao serem integrados na cadeia de DNA, inibem o seu alongamento, promovem a sua terminação, fragmentação e, por conseguinte, a apoptose celular. Assim, há o bloqueio das células cancerígenas nas fases G1/S do ciclo celular [39].
	5-Fluorouracilo <sup>i)</sup>	A sua forma ativa surge após a transição para o interior da célula, onde se forma um complexo capaz de inibir a formação da timidilato sintetase, o que impede a síntese de DNA e de RNA. Adicionalmente, este também pode ser incorporado nas cadeias destas duas moléculas, por substituição da timina ou uracilo, interferindo no seu processamento e, conseqüentemente, na síntese de proteínas [40].
	Metotrexato <sup>i)</sup>	Sustenta-se na inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de purinas e pirimidinas, condicionando a divisão celular e, por conseguinte, a proliferação das células cancerígenas [41].
Alquilantes	Ciclofosfamida <sup>iii)</sup>	Os seus efeitos antineoplásicos estão dependentes da sua metabolização por enzimas hepáticas. Deste processo, resultam metabolitos ativos capazes de estabelecer ligações cruzadas com as bases de guanina, nas cadeias de DNA enroladas em dupla hélice. Como tal, ocorrem alterações permanentes na molécula de DNA, tornando-a incapaz de se desenrolar e separar. Assim, a divisão celular está condicionada, tal como a transcrição do DNA para RNA [42].
À base de platina	Cisplatina <sup>i)</sup>	Este agente é hidrolisado assim que é incorporado no citoplasma da célula, obtendo-se a sua forma ativa, a qual se liga aos resíduos das purinas. Assim, o DNA é danificado, bloqueando a divisão celular e conduzindo à apoptose. A cisplatina é ainda capaz de promover o stress oxidativo, o que resulta na disfunção de proteínas, inibição da absorção de cálcio e redução do potencial da membrana mitocondrial. Como tal, são comprometidas funções biológicas essenciais à sobrevivência da célula [43].
Antraciclina	Doxorrubicina <sup>iii)</sup>	A ação destes agentes assenta em dois mecanismos distintos: i) a sua integração na molécula de DNA, inibição da topoisomerase II e redução da ação da helicase; ii) formação e acumulação de radicais livres, danificando proteínas, o DNA e a membrana celular das células neoplásicas. Desta forma, apesar de apresentarem atividade em todas as fases do ciclo celular, a Doxorrubicina e a Epirrubicina atuam principalmente nas fases S e G2 [44 - 45]
	Epirrubicina <sup>ii)</sup>	
Alcalóides de Vinca	Vincristina <sup>ii)</sup>	Este fármaco baseia-se na sua ligação à tubulina, a qual conduz à inibição da formação dos microtúbulos. Assim, verifica-se o <i>terminus</i> da mitose ainda na metáfase, pela interrupção da formação do fuso mitótico (fases M e S do ciclo celular). Adicionalmente, este agente é capaz de interferir na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, bloqueando a utilização do ácido glutâmico [46].

**Tabela 2** – Caracterização de alguns agentes utilizados na terapia direcionada em contexto clínico e incluídos nos protocolos selecionados para os ensaios *in vitro* da presente dissertação. Salvaguarda-se a sua inclusão em protocolos exclusivamente direcionados ao tumor maligno da mama (i) ou à metastização óssea (ii).

Classe	Agente direcionado	Mecanismo de ação
Anticorpo monoclonal	Transtuzumab <sup>i)</sup>	Este anticorpo liga-se ao domínio extracelular do HER2, inibindo a sua homodimerização. Neste sentido, a sinalização mediada por este recetor é bloqueada, o que condiciona o desenvolvimento das células cancerígenas que expressam HER2 [47].
	Denozumab <sup>ii)</sup>	A ação deste anticorpo passa pela sua ligação ao RANKL, impedindo, por sua vez, a ligação do RANKL ao seu recetor (RANK), o qual está presente na superfície dos osteoclastos [48]. Assim, a ausência da ligação RANKL-RANK inibe a formação e a função dos osteoclastos, o que conduz à redução da reabsorção óssea induzida pelo tumor maligno. Estudos recentes mostram, ainda, que os níveis de RANKL estão aumentados no estroma em torno do cancro da mama, pelo que este agente é capaz de os inibir, reduzindo os riscos que lhes estão associados [49].

## 2.5.2. Extrato de chá verde

As abordagens terapêuticas atualmente utilizadas no tratamento das doenças oncológicas, nomeadamente do tumor maligno da mama e do consequente desenvolvimento metastático (**2.1.4.1**), encontram-se associadas a uma panóplia de efeitos secundários, os quais incluem quer sinais imediatos, quer tardios, da sua toxicidade [50]. Neste contexto, e motivados pela procura de alternativas viáveis para a redução do impacto devastador destes agentes nos tecidos saudáveis, estudos reportados na literatura apontam para o potencial terapêutico e/ou adjuvante de alguns produtos naturais e dos seus constituintes. Neste sentido, têm sido desenvolvidas amplas investigações centradas nas ímpares propriedades do chá verde, que corresponde à segunda bebida mais consumida em todo em mundo [51].

O chá verde, cuja origem se encontra associada à planta *Camellia sinensis*, é definido como uma complexa mistura de polifenóis - compostos bioativos altamente antioxidantes, anti-inflamatórios e antimutagénicos - de entre os quais se destacam as catequinas e os flavonóides, cuja presença é maioritária neste produto natural [51].

É possível identificar várias catequinas no chá verde, como por exemplo: (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina-3-galhato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC) e (-)-epigallocatequina-3-galhato (EGCG), às quais estão associados os principais mecanismos de ação na prevenção, crescimento e proliferação de células neoplásicas [52]. Os mecanismos em questão, apesar de ainda não serem totalmente conhecidos, passam pela ativação de genes supressores tumorais, como por exemplo o *TP53*, pela regulação da apoptose celular (através das proteínas Bcl-2), bem como pela inibição da angiogénese e de outros fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral [52]. Adicionalmente, devido às reconhecidas propriedades antioxidantes, o composto natural em estudo evidencia a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigénio (ROS), as quais estão diretamente relacionadas com a indução de danos no DNA e a ativação de protooncogenes [52]. Por último, a modulação de genes envolvidos nas distintas etapas do processo carcinogénico corresponde a um outro possível mecanismo de ação associado ao chá verde [52].

Tendo por base as características supramencionadas, compreende-se que vários estudos pré-clínicos se centrem na análise deste poderoso composto natural como potencial substância preventiva e terapêutica no domínio da Oncologia [53]. Neste âmbito, foram definidos alguns dos objetivos da presente dissertação, bem como desenhadas as metodologias que sustentam a avaliação de um extrato de chá verde (*Green Tea Extract poder – MyProtein®*) como possível adjuvante dos vários agentes terapêuticos (**2.1.4.1**).

Torna-se ainda relevante salvaguardar que, apesar de todas as perspetivas para a definição de abordagens preventivas e terapêuticas versáteis com recurso ao chá verde, uma sobredosagem deste composto natural pode estar na origem de complicações adversas, nomeadamente, a nível hepático, além de ser necessária precaução em doentes renais, cardíacos e hipertensos [54].

### 3. Materiais e Metodologias

A presente secção contempla a descrição de todas as metodologias adotadas e materiais utilizados na execução dos estudos *in vitro* e *in vivo* que sustentam o desenvolvimento da presente dissertação. Ao longo dos subcapítulos que se seguem são ainda caracterizadas as linhas celulares e o modelo animal selecionado, bem como justificados todos os procedimentos que culminam na obtenção dos resultados reportados no próximo capítulo.

#### 3.1. Caracterização da linha celular

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* efetuados tiveram por base a seleção e utilização da linha celular MCF-7 (ATCC® HTB-22™), derivada de um adenocarcinoma mamário humano. Estudos já reportados na literatura comprovam a sua adequação à investigação na área do cancro, incluindo aquela que se centra na análise de agentes quimioterapêuticos, coadunando-se, desta forma, com um dos objetivos centrais do presente trabalho. A linha celular em questão foi adquirida pelo Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra à *American Type Culture Collection* (ATCC®), mantendo-se em criopreservação, em alíquotas *stock*, por forma a assegurar a manutenção da sua qualidade durante o armazenamento, e um número de passagem celular (#) baixo.

##### ⇒ Células MCF-7

A linha celular MCF-7 teve a sua origem em 1970, quando o investigador Dr. Herbert D. Soule da *Michigan Cancer Foundation* - de onde deriva o seu nome - tentou desenvolver uma linhagem de células a partir da excisão de um nódulo da parede torácica e de um derrame pleural de uma mulher caucasiana de 69 anos, previamente diagnosticada com cancro de mama metastático [55]. As células em questão distinguem-se pela manutenção das características de epitélio mamário diferenciado, motivo pelo qual têm sido amplamente estudadas [55].

O perfil molecular da linha MCF-7 evidencia uma das suas principais particularidades: a presença de recetores de estrogénio alfa (RE $\alpha$ ), capazes de processar estrogénio, na forma de estradiol. É nesta especificidade que reside também o seu enorme potencial, já que apresenta a capacidade de mimetizar o cancro da mama invasivo que expressa recetores de estrogénio [56]. Para além de exibirem uma resposta positiva para os recetores supramencionados, o desenvolvimento das células MCF-7 é ainda controlado positivamente por recetores de progesterona e negativamente por fatores de crescimento associados à membrana plasmática, nomeadamente o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ativado pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) [55].

No que concerne à cultura desta linha celular de cancro epitelial, identificam-se algumas características comuns às células epiteliais mamárias normais, particularmente a capacidade de formar agregados tridimensionais multicelulares esferóides, descritos como uma massa celular com núcleos desorganizados e com fortes ligações célula-a-célula [55]. No entanto, estes agregados esferóides são potenciais regiões de morte celular, o que conduz à libertação gradual de células, culminado num crescimento celular em monocamada, que requer a ancoragem a uma superfície plana [57].

Ao longo dos anos, no campo da investigação científica, o aumento do recurso à linha celular MCF-7 reflete a sua fidelidade a muitos aspetos do tumor maligno da mama em contexto clínico [56]. Todavia, as células cancerígenas em questão, inseridas na categoria Luminal A, são definidas na literatura como pouco agressivas, o que justifica o seu lento crescimento, fator condicionante em vários estudos [55].

Tendo como sustentação todas as características supramencionadas associadas à linhagem de células MCF-7, compreende-se a necessidade de manutenção das condições ideais à sua dissociação e necessárias para a progressão de ensaios *in vitro*. Adicionalmente, estudos *in vivo* com recurso a estas células pressupõem a suplementação com estrogénio, no sentido de se desenvolverem tumores sólidos e de se induzirem processos metastáticos [55].

## 3.2. Cultura celular

A cultura celular detém um papel fundamental na investigação científica, já que viabiliza o isolamento e/ou crescimento de células no exterior do organismo de origem, através de um conjunto de requisitos que visam mimetizar o ambiente *in vivo*. Neste sentido, e para o desenvolvimento da presente dissertação, foram asseguradas as condições ideais à manipulação inerente ao processo de cultura celular.

Todos os procedimentos, cuja descrição é efetuada nas seguintes subsecções, foram executados numa sala de cultura de células, onde se verificam as requeridas condições de assepsia. Desta forma, para além da utilização constante de luvas e batas desinfetadas, os protocolos selecionados pressupõem o recurso a uma câmara de fluxo laminar vertical (*Holten Lamin Air*, HB2448, USA), equipada com um sistema de circulação forçada de ar, fundamental na prevenção de possíveis contaminações das amostras biológicas. É de notar que todo o material manipulado no interior da câmara em questão e que, por sua vez, está em contacto com o conteúdo biológico, se encontra devidamente esterilizado, assim como pulverizado com etanol a 75% - destrói a membrana celular das bactérias, desnatura as suas proteínas e dissolve os seus lípidos, contribuindo para manutenção das condições de esterilidade. Adicionalmente, em várias das metodologias inframencionadas, é necessária a observação das células em cultura, pelo que, dadas as características das células MCF-7 (ausência de coloração e crescimento em aderência), é exigida a utilização de um microscópio ótico de contraste de fase ou microscópio invertido (MOCF) (Nikon Eclipse, TS100, Japão) – considerando a diferença de fase dos raios luminosos que atravessam o fundo, relativamente à luz que atravessa a amostra biológica. Por outro lado, em determinadas etapas do trabalho experimental, foi indispensável o recurso a uma centrífuga (Heraeus Multifuge 1L-R, EUA) refrigerada a 4°C - no sentido de prevenir contaminações e de reduzir o metabolismo celular - programada a 1 100 rotações por minuto (rpm) – para manter a integridade da membrana citoplasmática. Dada a sensibilidade característica do processo de cultura celular, foi essencial o aquecimento do meio de cultura num banho-maria termostaticado (Tissue water bath, GFL 1002, Alemanha, certificado pela Staff&Line, Portugal), assim como a respetiva manutenção da cultura numa incubadora dedicada (Binder, Dias de Sousa S.A, Portugal), associada a um sistema de botijas de CO<sub>2</sub> (BIOGON® C(E290), *The Linde Group*, Alemanha). O controlo do ambiente da incubadora é fulcral para a adesão e proliferação celulares, devendo, desta forma, ser assegurada uma temperatura de 37°C - mimetizando a temperatura do organismo -, atmosfera humificada a 95% - para evitar a evaporação do meio de cultura e, por isso, garantir a manutenção da osmolalidade (pressão osmótica) – e uma concentração de CO<sub>2</sub> de 5% - conservando-se o equilíbrio ácido base.

Por último, salienta-se a importância do cumprimento de todas as regras de segurança de manipulação de amostras biológicas, obrigatórias ao longo de toda a prática laboratorial. Assim, a conclusão dos procedimentos descritos só é finalizada com a inativação com lixívia de todo o material em contacto com o conteúdo celular e posterior descarte, em recipientes apropriados para incineração. Adicionalmente, caso se verifiquem as devidas condições de reutilização, o material é corretamente inativado com lixívia e, sucessivamente, lavado com água corrente e água destilada, para consecutiva autoclavagem.

### 3.2.1. Meio de cultura

A escolha do meio de crescimento corresponde a um dos passos cruciais do processo de cultura *in vitro*, devendo ser adequado à linhagem de células selecionada, no sentido de assegurar o correto desenvolvimento do trabalho experimental.

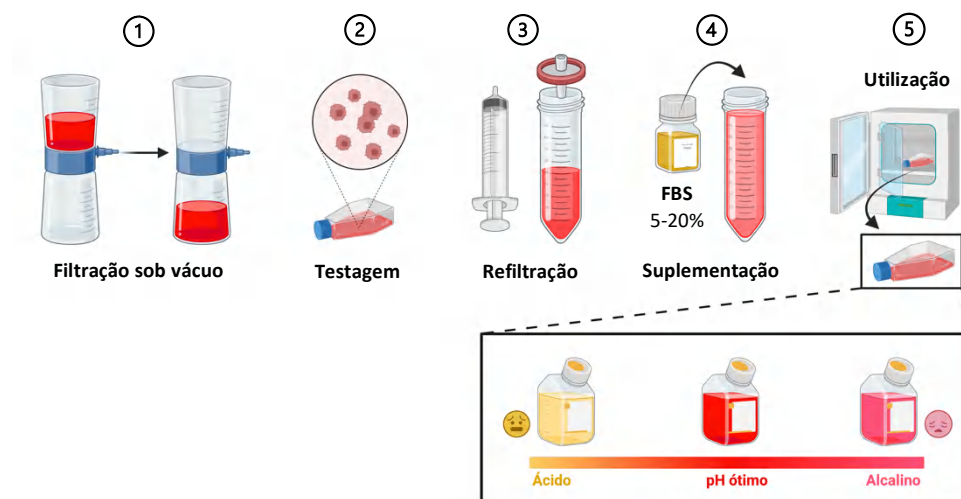
Considerando que o meio de cultura integra uma fonte apropriada de energia e compostos que regulam o ciclo celular, é compreensível que este seja o principal agente de manutenção do pH e da osmolalidade, assim como o fator potenciador do crescimento e proliferação das células em cultura. Desta forma, na sua composição identificam-se vitaminas, aminoácidos, sais inorgânicos, glicose, soro, hormonas e fatores de fixação [58]. Os sais inorgânicos são responsáveis pela manutenção do equilíbrio osmótico, regulação do potencial da membrana celular e, juntamente com os fatores de fixação, são fundamentais para a matriz de adesão celular. Simultaneamente, as vitaminas funcionam como precursores de diferentes fatores. De entre estas destacam-se as vitaminas do complexo B, cuja ação é determinante para o crescimento e proliferação celulares. A necessidade destes componentes altera-se consoante a linha celular em questão, sustentando, assim, as variantes associadas à formulação do meio de cultura.

O meio de cultura utilizado para a execução da presente dissertação é designado por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco® 1x, 11966-025, RU), sendo amplamente utilizado para os vários fenótipos de células aderentes [59]. É de notar que, apesar da sugestão do fornecedor da linha celular MCF-7 remeter para a utilização de *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), recorreu-se à fórmula modificada de Dulbecco, uma vez que esta corresponde a uma versão suplementar aprimorada da primeira, na qual o conteúdo de aminoácidos e vitaminas selecionado está aumentado para o quádruplo, comparativamente com a versão original de Eagle [58]. Adicionalmente, o meio definido como base para a cultura celular em questão é ainda suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Pen/Strep) (Lonza Pen Strep, Amphotericin, B 100x, 17-745E, EUA), que, sendo uma mistura antibiótica, controla e impede o crescimento fúngico e bacteriano. O enriquecimento considera ainda a adição de 1% de L-glutamina (Biowest, LGlutamine 100x, 200nM, XO55O-100, EUA), um aminoácido essencial, que intervém no processo de glicogénese e na manutenção da homeostasia ácido-base [58].

A preparação do meio de cultura, ilustrada na **Figura 8**, esta é executada no laboratório, a partir de reagentes em pó, com recurso obrigatório à câmara de fluxo laminar. Este procedimento pressupõe, numa primeira instância, a esterilização do meio, através de um sistema de filtração sob vácuo. Numa segunda fase, este é convenientemente testado – durante um período mínimo de 2-3 dias - de forma a assegurar a ausência de qualquer contaminação microbiológica. Admitindo-se a presença das condições ideais na fração de meio a teste, procede-se à sua refiltração usando filtros de seringa (Merck Millipore SLGSR33SS Syringe Filter Millex (33mm, 0,22µm (EOG))), para continuar a restringir ao mínimo a possibilidade de contaminação.

O desempenho ótimo do meio de cultura é garantindo, ainda, pela sua íntegra conservação no frigorífico a 4°C e na ausência de luz, considerando que esta exposição potencia a degradação de vitaminas fundamentais ao crescimento celular. Antes da sua utilização, o meio deve ser aquecido num banho de água termostaticado a 37°C e, subsequentemente, suplementado, na câmara de fluxo laminar, com 5-20% (de acordo com cada situação experimental) de Soro Fetal Bovino (FBS) (Sigma-Aldrich®, F7524, EUA), essencial ao desenvolvimento celular. O FBS fornece fatores de crescimento, transportadores de nutrientes insolúveis em água e hormonas, sendo ainda capaz de neutralizar a ação de frações tóxicas [58].

Por último, relativamente à descrição do meio de cultura utilizado, é importante destacar a presença do indicador de pH - vermelho de fenol - que permite uma avaliação visual rápida quanto à ação metabólica e nível de crescimento celular, que se traduz num aumento da concentração de metabolitos ácidos no meio. Desta forma, o vermelho de fenol é capaz de indicar se ocorreu maior ou menor proliferação celular, consumo de nutrientes e consequente produção metabólica, alterando a sua coloração de vermelho - pH ótimo - para amarelo/alaranjado - pH ácido. Esta avaliação, complementada com a observação da cultura de células ao MOCF, permite inferir acerca da eventual necessidade de mudança de meio/manutenção celular (**3.2.3**).

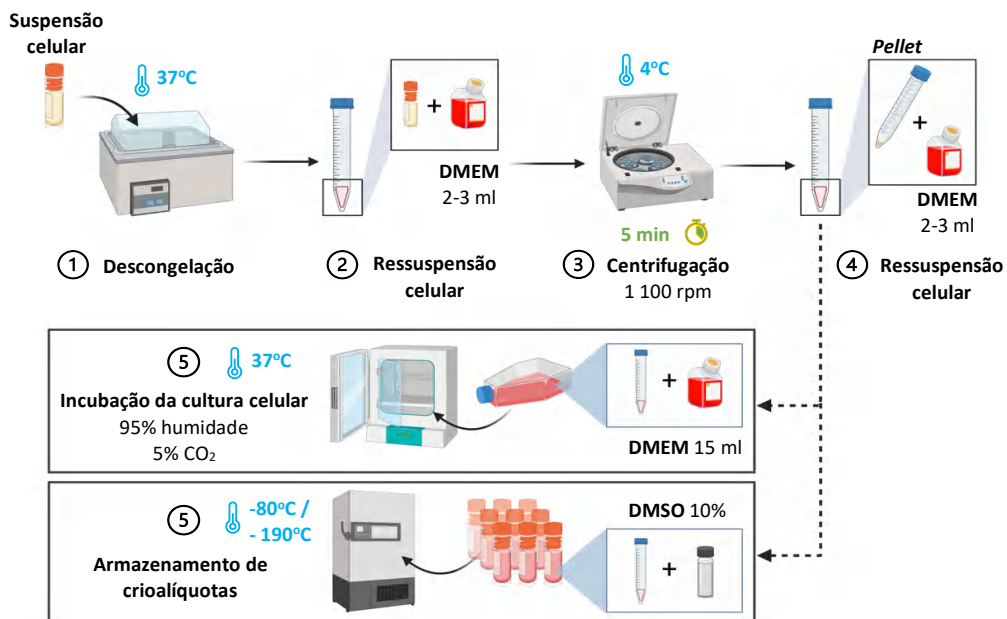


**Figura 8** - Descrição ilustrativa das diferentes etapas que constituem a preparação e garantia de funcionalidade do meio de cultura.

### 3.2.2. Expansão das linhas celulares e descongelamento

A criopreservação é o processo através do qual se garante que as células fornecidas pela empresa certificada ATCC® se mantêm preservadas por longos períodos e com uma passagem baixa. Desta forma, a amostra original, contida num *vial* de criopreservação, foi submetida a um protocolo de expansão, no sentido de se assegurar a disponibilidade de um número adequado de alíquotas para realização de muitos ensaios posteriores e utilização por vários grupos/investigadores. Neste sentido, as células da amostra original foram, em primeiro lugar, descongeladas num banho de água termostaticado a 37°C. Posteriormente, e já na câmara de fluxo laminar, a suspensão celular foi transferida para um *falcon* de 15 ml (SARSTED 15 ml, 62.554.502, Alemanha) e é ressuspensa em 2-3 ml de DMEM, devidamente suplementado como sistematizado em 3.2.1, por forma a inibir a ação do agente criopreservante<sup>3</sup> – dimetilsulfóxido (DMSO) (SigmaAldrich®, D2650, EUA). A ressuspensão foi centrifugada a 1 100 rpm, durante 5 min, a 4°C, tal como justificado em 3.2. Após este processo, novamente na câmara de fluxo laminar, descartou-se o sobrenadante, excluindo-se assim toda a mistura de criopreservação, e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de DMEM. A nova ressuspensão celular foi transferida para um frasco de cultura estéril de 25 cm<sup>2</sup>, com 15 ml de DMEM suplementado, assegurando o correto desenvolvimento e proliferação celulares. O frasco de cultura foi mantido na incubadora a 37°C, com a atmosfera humificada a 95% e com uma concentração de CO<sub>2</sub> de 5%. Tendo por base um acompanhamento diário da cultura celular, com recurso ao MOCF, foi avaliada a necessidade da sua manutenção, cujo protocolo se encontra descrito em 3.2.3., assim como verificada a sua confluência. Quando o crescimento das células em superfície atinge um valor próximo dos 70-80%, procede-se à sua dissociação (3.2.4) e posterior transferência para frascos de maiores dimensões, para depois preparar alíquotas para criopreservação, com a necessária adição do agente criopreservante a 10%. As alíquotas foram armazenadas durante algumas horas a -80°C (Thermo Scientific, Herafreeze HFUT Series, EUA) e, subsequentemente, transportadas para uma câmara de azoto líquido a -190°C (ThermoNorma, Cryoplus 1, EUA), para armazenamento prolongado.

Este procedimento, ilustrado pelo esquema da **Figura 9**, garante um processo para a manutenção das características típicas desta linha. Algumas das novas alíquotas podem ser armazenadas a -80°C por um período curto (até 6 meses), para realizar ensaios *in vitro* programados. Quando se pretendem usar as células para iniciar o estudo é descongelada uma das alíquotas *stock* e feita a expansão celular segundo o protocolo acima descrito. Este procedimento é repetido sempre que se pretendem usar/renovar as linhas celulares em cultura. É de salientar que a linha celular utilizada possui um período característico para uma ótima adesão e crescimento de aproximadamente 72 h, que deve ser respeitado antes de qualquer manipulação.



**Figura 9** – Ilustração do procedimento laboratorial associado à expansão das linhas celulares e descongelamento.

<sup>3</sup> Agente criopreservante – DMSO: reagente que retarda a formação de cristais de água, considerando que, na composição celular, mais de 90% corresponde a água.

### 3.2.3. Manutenção celular

Tal como supracitado em 3.2.1, a avaliação do crescimento e proliferação das células em cultura é realizada, com uma frequência diária, a partir da análise visual da cor do meio de cultura – pela presença do indicador de pH vermelho de fenol - conjugada com a sua observação ao MOCF. Neste sentido, e considerando o perfil da linhagem celular MCF-7 descrito em 3.1, é fundamental a mudança do meio de cultura quando há a alteração do respetivo pH, já que as células em questão são extremamente sensíveis ao ambiente ácido. Desta forma, sempre que se verifique a condição anterior, pela presença de metabolitos e pela consequente existência de células em suspensão, aplica-se o procedimento descrito na **Figura 10**.



**Figura 10** – Sequência ilustrativa dos procedimentos necessários à manutenção da cultura celular.

O referido procedimento prevê a aspiração de todo o meio de cultura, dentro da câmara de fluxo laminar, com recurso ao a um pipetador automático (*Gilson, Pipetting Aid 080333, França*) acoplado a pipetas de *Pasteur* de vidro estéril (*VWR<sup>®</sup>, Pasteur Pipettes 612-1702, França*). De seguida, é adicionado o novo meio de cultura, aproximadamente 15 ml, consoante a dimensão do frasco, preparado segundo o protocolo apresentado em 3.2.1. Garantindo-se, novamente, todas as condições de assepsia, o frasco é pulverizado com etanol a 75% e reinserido na incubadora, onde se verificam as condições ideais à proliferação celular.

Por outro lado, sempre que, aquando da observação inicial ao MOCF, se identifique que a confluência apresenta um valor próximo dos 70-80%, é fundamental proceder-se à dissociação celular, processo descrito em 3.2.4. Esta monitorização é imprescindível, de forma a garantir que o número de células por frasco não ultrapasse aquele que viabiliza o crescimento celular em monocamada, já que as células MCF-7 se caracterizam pela elevada suscetibilidade à ausência de espaço.

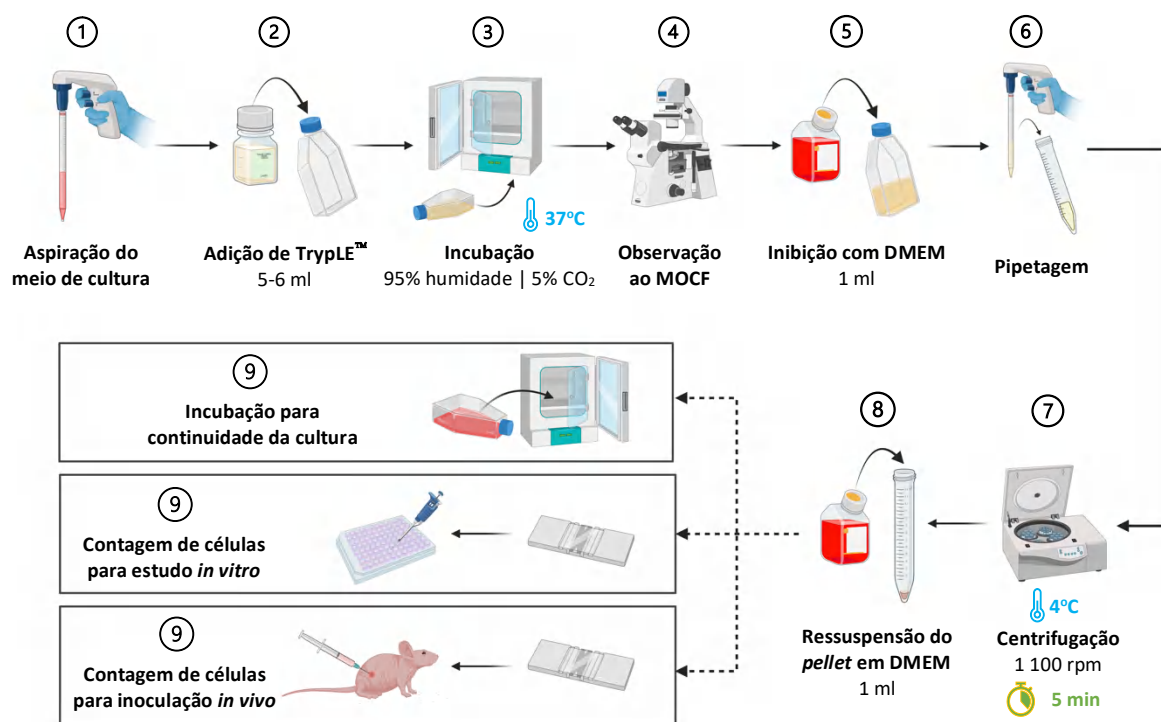
### 3.2.4. Dissociação Celular

O processo de dissociação celular é adotado sempre que estão comprometidas as condições ideais ao crescimento e proliferação celulares, tal como detalhado em 3.2.3. Desta forma, considerando que a morfologia da linhagem MCF-7 requer a sua adesão a uma superfície plana, conferida pelo frasco de cultura, é necessário um método específico para a quebra da interação estabelecida. A metodologia de dissociação de células aderentes pode ser distinguida entre mecânica - sustentada por agentes físicos - e enzimática.

De acordo com a literatura, a ação de enzimas é a técnica de dissociação mais frequente no campo da cultura celular, já que interfere menos com a integridade da membrana das células, comparativamente com o efeito dos agentes físicos. Assim, no presente estudo recorreu-se à dissociação enzimática, executada usando a solução *TrypLE<sup>™</sup> Express (Gibco<sup>®</sup> by life technologies<sup>™</sup>, Dinamarca)*, que corresponde a uma enzima fúngica recombinante produzida por fermentação. Esta enzima pode ser classificada como uma serina-protease (enzima proteolítica), sendo a sua atividade muito semelhante à da tripsina [60]. Ou seja, com uma menor toxicidade celular, a solução enzimática selecionada é capaz de clivar as mesmas ligações peptídicas entre os aminoácidos das adesinas. É de notar que as adesinas, nomeadamente a lisina e a arginina, são essenciais para a manutenção da integridade da matriz extracelular, sendo por isso fundamentais à ancoragem das células à superfície do frasco de cultura. Neste sentido, a ação das proteases em questão promove a rutura da matriz extracelular, conduzindo à obtenção de células individualizadas.



A execução do protocolo de dissociação celular adotado (**Figura 11**) tem início com a remoção do meio de cultura dos frascos, respeitando-se o procedimento descrito em **3.2.3**. Posteriormente, são adicionados 5-6 ml da solução *TrypLE™ Express*, recolocando-se, em seguida, os frascos de cultura celular no interior da incubadora, nas condições anteriormente descritas durante um período aproximado de 5 min, para promover a ação enzimática. É de salvaguardar a importância do respeito pelo tempo de atividade da enzima proteolítica, para prevenir a ocorrência de lise celular. A avaliação da ação do agente de dissociação é efetuada ao MOCF, para se aferir se a maioria das células se encontra em suspensão. Verificada a premissa anterior, procede-se à adição de 1 ml de meio suplementado com FBS, dentro da câmara de fluxo laminar, para neutralizar a ação do *TrypLE™*, já que o meio apresenta alfa1-anti-tripsina na sua constituição. Uma vez inativado o agente enzimático, é realizada a pipetagem cautelosa da suspensão celular, com um pipetador automático acoplado a pipetas de *Pasteur* de vidro estéril. Este conteúdo é transferido para um *falcon* de 15 ml, devidamente esterilizado e identificado, sendo, subsequentemente, centrifugado a 1 100 rpm, durante 5 min e a 4°C, tal como justificado em **3.2**. Concluída a etapa anterior, e novamente dentro da câmara de fluxo laminar, é descartado o sobrenadante, sendo o *pellet* ressuscitado em 1 ml de meio previamente suplementado. Desta forma, a suspensão celular obtida serve de base ao desenvolvimento de estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo para ambos necessária a contagem de células, cujo protocolo se encontra detalhado em **3.2.5**. Por outro lado, caso se pretenda a continuidade da proliferação celular, a ressuspensão do *pellet* é transferida para um frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, ao qual se adicionam 15 ml de meio suplementado. Após a identificação com a linha de células em estudo, a data e a passagem correspondente, o frasco é pulverizado com etanol a 75% e acomodado na incubadora, garantindo as condições ideais à expansão celular.



**Figura 11** – Síntese esquemática do protocolo de dissociação celular e possíveis procedimentos subsequentes.

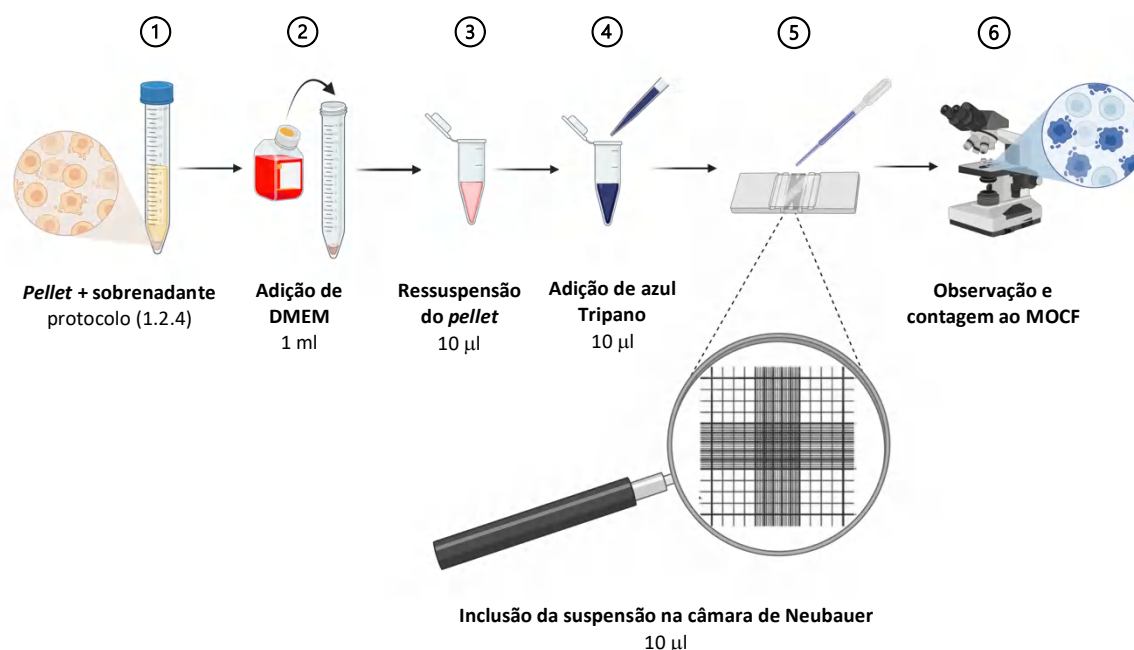
### 3.2.5. Contagem de células

A quantificação do número de células em cultura por unidade de volume corresponde a um procedimento fundamental ao desenvolvimento do presente estudo, considerando que serve de base ao plaqueamento de células para os ensaios *in vitro* (**3.3.1**) e à preparação da suspensão celular a inocular nos ensaios *in vivo* (**3.4**). Neste sentido, a quantificação em questão é efetuada através da contagem das células presentes num volume bem definido, sendo para este efeito utilizada uma câmara de contagem apropriada.

O procedimento executado pressupôs o recurso a uma câmara de *Neubauer* (*Neubauer Improved* de fundo espelhado, 0640030, Alemanha), ilustrada na **Figura 12**, a qual possui duas zonas de contagem separadas por um sulco horizontal, podendo, desta forma, ser utilizadas de forma independente. A superfície de contagem apresenta uma forma quadrada, com 3 mm de lado (9 mm<sup>2</sup> de área), que se encontra dividida em 9 grandes quadrados, por sua vez com uma área unitária de 1 mm<sup>2</sup> [61]. Simultaneamente, cada um dos grandes quadrados situados nos vértices da superfície de contagem encontra-se também repartido em 16 quadrados de menores dimensões, cuja lado mede 0,25 mm. O grande quadrado central apresenta uma divisão em 25 quadrados médios que, por sua vez, se voltam a dividir em 16 pequenos quadrados, viabilizando a quantificação em amostras com uma elevada densidade celular [61]. Dadas as características das células em cultura, na presente investigação, foi considerado o número médio de células existentes nos 4 grandes quadrados das extremidades para a determinação da concentração celular.

O protocolo selecionado (**Figura 12**) aplica-se após a metodologia descrita na secção anterior (**3.2.4**) e tem início com a adição de 1 ml de DMEM, previamente suplementado, para a ressuspensão do *pellet* celular obtido. Posteriormente, da suspensão homogeneizada obtida são pipetados 10 µl e transferidos para um *ependorf* estéril de 2 ml (DeltaLab S.L., 4092.7N, Espanha), ao qual se adicionam 10 µl do corante azul tripano (Sigma-Aldrich®, T0776, EUA). Este é um corante vital essencial para a distinção das células viáveis e não-viáveis ao MOCF, considerando a capacidade de as primeiras excluírem o corante do seu citoplasma (que permanece claro), uma vez que a sua membrana celular se encontra intacta [62]. Por outro lado, as células não-viáveis, seguindo o raciocínio oposto, apresentarão uma coloração azul ao MOCF, dada a inclusão do corante azul tripano. Garantindo-se a correta homogeneização da solução, no sentido de se evitarem aglomerados, são pipetados, novamente, 10 µl para introdução na câmara de *Neubauer*, sob uma lamela de vidro (RS, *Cover Glass* 100 PCS *Thickness* 0,13-0,17 mm, França). Por último, ao MOCF, após ser ajustada a posição ideal para a observação de cada um dos grandes quadrados das extremidades da câmara, procede-se à determinação das células presentes nos 16 quadrados de dimensões inferiores. É de notar que a contagem em questão deve ser realizada respeitando-se uma trajetória em serpentina, evitando-se a contagem da mesma célula mais do que uma vez. Adicionalmente, com o objetivo de uniformizar quantificações, não são consideradas células que se encontrem sobre as linhas que definem cada um dos vários quadrados.

Atentando que cada um dos quadrantes possui um volume igual a 0,1 mm<sup>3</sup> (1 mm de lado × 1mm de lado × 0,1 mm de profundidade – conferida pela lamela), após a contagem do número médio de células presentes em cada um dos quadrantes, obtém-se o número de células existentes em 0,0001 ml multiplicando pelo fator 10<sup>4</sup>. Desta forma, nesta sequência, é possível determinar o número de células por ml de suspensão, sendo que, caso tenha sido realizada alguma diluição, é necessária à sua multiplicação pelo respetivo fator.



**Figura 12** – Reprodução da metodologia adotada para a contagem de células e representação da câmara de *Neubauer* utilizada para o processo.

### 3.3. Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* detêm um papel basilar na progressão da investigação científica, já que viabilizam o isolamento e a avaliação específica de parâmetros bem definidos. Neste sentido, os ensaios *in vitro* realizados, numa primeira fase do desenvolvimento da presente dissertação, objetivaram a análise da influência de múltiplos agentes quimioterapêuticos, assim como a sua associação a um extrato de chá verde em estudo - *Green Tea Extract powder* (GTE po) (*Green Tea Extract powder, MyProtein*, 500 g, 1705807841) – como potencial agente coadjuvante para redução da proliferação celular neoplásica maligna.

A execução da experiência em questão, que sustentou o desenho do ensaio terapêutico aplicado no modelo animal (3.4.1.3), pressupôs o plaqueamento celular (3.3.1), bem como a elaboração de um protocolo experimental baseado quer na transposição dos protocolos quimioterapêuticos usados na clínica para as condições do modelo *in vitro*, quer nas características do GTE po (3.3.2).

#### 3.3.1. Plaqueamento celular

O plaqueamento celular implica, em primeiro lugar, a sementeira de células nas placas de cultura selecionadas para a execução dos ensaios *in vitro* - caixas de 48 poços, com uma área de poço igual a 0,95 cm<sup>2</sup> (*SPL Life Sciences*, 30048, Coreia). Este procedimento assenta no conhecimento previamente adquirido pela equipa de investigação que, em estudos anteriores, determinou a proporção  $7,2 \times 10^3$  células/poço como sendo ideal para a linhagem MCF-7 nas caixas de 48 poços. Esta noção é fundamental para a garantia da área necessária ao crescimento das células cancerígenas em estudo, evitando a morte celular devido à ausência das condições ideais e o enviesamento dos resultados obtidos. Assim, após serem cumpridas as metodologias sintetizadas em 3.2.4 e 3.2.5, foi calculado o volume de suspensão celular obtida que respeitava a proporção supramencionada. Posteriormente, o volume determinado foi pipetado e colocado no centro de cada poço, ao qual foram adicionados 400 µl de DMEM, devidamente suplementado (FBS 5%) (3.2.1), de forma a promover a cultura celular durante 72 h, nas condições de incubação. Note-se que até ao *terminus* deste período, nenhum composto foi adicionado, proporcionando-se uma ausência de estímulos externos.

#### 3.3.2. Protocolo experimental

O procedimento experimental desenhado tem como cerne a aplicação de diferentes estímulos, em cada um dos poços das placas de cultura, após as 72 h de adesão e proliferação celular. Os estímulos em questão correspondem à adição de um ou múltiplos quimiofármacos protocolados na clínica, aplicados de forma isolada e combinada com diferentes concentrações do extrato de chá verde em estudo (GTE po 0,5 – 5 – 10 µg/ml). Salienta-se que, a estimulação celular com o GTE po, cuja preparação será descrita em 3.3.2.2, decorreu ao longo de 6 dias consecutivos, ou seja, o estudo *in vitro* contou com 6 aplicações do composto (1 vez/dia). Esta frequência de adição, também resultante de estudos prévios realizados pela equipa, apresentou resultados mais promissores, comparativamente com a aplicação de GTE po ao longo de 3 dias consecutivos, motivo pelo qual é respeitada ao longo do desenvolvimento da presente dissertação [63]. Por outro lado, os estímulos com recurso aos agentes quimioterapêuticos foram realizados de acordo com a frequência e as concentrações protocoladas, de forma a mimetizar as condições clínicas verificadas no tratamento humano, tal como exposto em 3.3.2.1.

Antes da exposição da metodologia adotada, é importante salientar que toda a distribuição dos ensaios pelas caixas de cultura foi desenhada de forma a garantir a presença de 2 colunas controlo por caixa, de modo a assegurar uma correta padronização, cujo princípio é explicado no capítulo que se segue. Adicionalmente, é fundamental salvaguardar que todos os fármacos isolados e respetivas associações, quer com outros agentes quimioterapêuticos, quer com o composto em estudo - GTE po - foram testados em igual número de poços de cultura. Ou seja, cada combinação realizada apresenta uma amostra igual a 36 poços, assegurando-se a robustez amostral de toda a experiência *in vitro*, de acordo com as premissas da estatística.

Quanto ao procedimento prático, este requer planeamento prévio, com a esquematização da distribuição dos agentes em estudo pelos diferentes poços de cultura, respeitando-se as condições supramencionadas. Desta forma, tendo por base que a capacidade volúmica ideal de cada poço é de 500 µl,

foi determinado o volume de DMEM a adicionar, considerando os estímulos que serão realizados ao longo dos 6 dias de estimulação. Uma vez cumprido este requisito e decorridas as 72 h após o plaqueamento celular, em ambiente estéril, o meio de cultura é cuidadosamente removido com recurso a uma micropipeta (*BioPette™ Plus*). Posteriormente, é adicionado a cada poço o novo meio de cultura, suplementado a 5%, assim como o(s) respetivo(s) agente(s) quimioterapêutico(s) e/ou GTE po, de acordo com o desenho de estudo concebido. Quando concluídas as etapas anteriormente mencionadas, as quais determinam o início de estudo, procede-se à incubação das caixas de cultura, nas condições descritas nos subcapítulos precedentes. Em cada um dos restantes 5 dias de ensaio experimental é repetida a estimulação com GTE po e/ou agente quimioterapêutico nalguns casos, respeitando-se novamente a esquematização idealizada.

### 3.3.2.1. Quimiofármacos

Os agentes terapêuticos em estudo ao longo dos ensaios *in vitro*, cujo mecanismo de ação foi explorado ao longo da secção 2.5.1, encontram-se detalhadamente protocolados de acordo com a sua utilização clínica. Assim, foram selecionados diferentes protocolos terapêuticos, quer para o tumor maligno da mama, quer para o cenário de metastização óssea, de forma a concretizar um dos objetivos da presente dissertação.

Os protocolos em questão encontram-se sintetizados na **Tabela 3**, sendo que cada fármaco e cada combinação farmacológica foi testada, *in vitro*, isoladamente e em associação com o agente coadjuvante natural em estudo - GTE po (**3.3.2.2**) - totalizando 116 combinações distintas testadas. Neste sentido, e de acordo com a concentração dos fármacos cedidos pelo CHUC, foi devidamente realizada a transposição dos protocolos clínicos para as condições do ensaio. Para tal, respeitando-se a dosagem administrada por doente, assim como a frequência de tratamento, foi calculado o volume do agente quimioterapêutico a adicionar a cada poço. Note-se que a área de poço considerada foi de 0,95 cm<sup>2</sup>, tal como já referido. É de destacar que, no caso de se terem determinado volumes de fármaco, a adicionar a cada poço, inferiores ao respetivo erro de medição da micropipeta utilizada para o efeito, procedeu-se à sua respetiva diluição. Para este procedimento foi utilizado um tampão fosfato salino estéril, do inglês *Phosphate Buffered Saline* (PBS), preparado e autoclavado no laboratório, uma vez que previne a desnaturação e o aparecimento de alterações conformacionais dos componentes farmacológicos.

**Tabela 3** - Síntese dos protocolos clínicos selecionados para os ensaios *in vitro*.

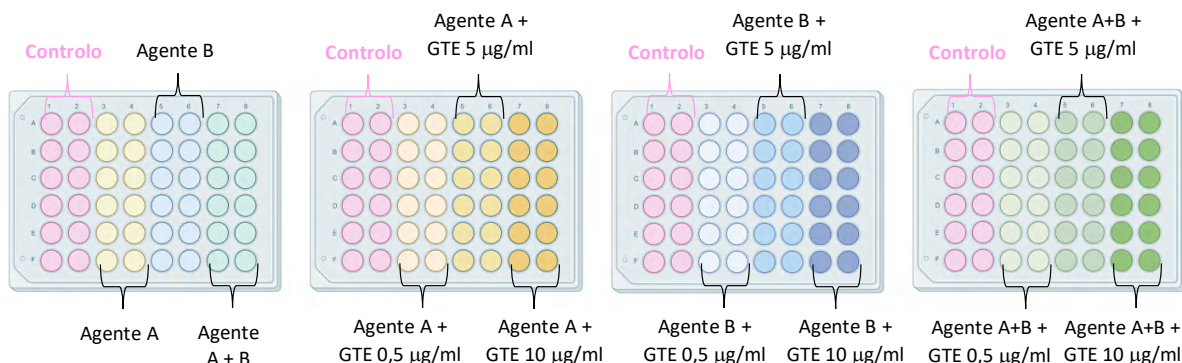
Protocolo terapêutico	Fonte	Contexto clínico
<b>Paclitaxel</b> (175 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Gemcitabina</b> (1 250 mg/ m <sup>2</sup> )	[64]	Tumor maligno da mama
<b>Cisplatina</b> (75 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Gemcitabina</b> (1 250 mg/ m <sup>2</sup> )	[65]	
<b>Ciclofosfamida</b> (600 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Doxorrubicina</b> (60 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Transtuzumab</b> (8 mg/kg)	[66]	
<b>Docetaxel</b> (75 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Ciclofosfamida</b> (600 mg/m <sup>2</sup> )	[67]	
<b>Docetaxel</b> (88 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Gemcitabina</b> (950 mg/ m <sup>2</sup> )	[68]	
<b>Docetaxel</b> (63 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Gemcitabina</b> (1 750 mg/ m <sup>2</sup> )	[68]	
<b>5-FU</b> (600 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Metotrexato</b> (40 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Ciclofosfamida</b> (600 mg/m <sup>2</sup> )	[69]	
<b>Ácido Zoledrónico</b> (4 mg/pessoa)	[70]	Metastização óssea
<b>Denozumab</b> (120 mg/pessoa)	[71]	
<b>Vincristina</b> (2 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Epirubicina</b> (75 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Ciclofosfamida</b> (1 200 mg/m <sup>2</sup> )	[71]	
<b>Vincristina</b> (2 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Doxorrubicina</b> (75 mg/m <sup>2</sup> ) + <b>Ciclofosfamida</b> (1 200 mg/m <sup>2</sup> )	[71]	

### 3.3.2.2. Green Tea Extract powder (GTE po)

Considerando as propriedades intrínsecas do extrato de chá verde, exploradas ao longo da secção 2.5.2, assim como a necessidade de se avaliar o seu potencial como agente coadjuvante natural no tratamento do cancro mama, foi executado o protocolo experimental supramencionado. Neste sentido, preparou-se a solução *stock* do extrato em questão, para posterior utilização nos ensaios *in vitro*. Com recurso a uma

balança analítica eletrônica (*Radlag*, AS 220/c/2, Alemanha), foi medida a quantidade do composto *Green Tea Extract powder*, adquirido pela equipa de investigação, a ser dissolvida em PBS.

Com base na concentração da solução obtida, variável consoante a massa de GTE po e o volume de PSB considerado, prepararam-se as soluções de extrato de chá verde utilizadas para a estimulação celular *in vitro*. Desta forma, foram realizadas as diluições necessárias para a obtenção das soluções de GTE po compatíveis com as concentrações em estudo: 0,5 - 5 - 10 µg/ml. A cada poço, de acordo com o desenho da distribuição do estudo pelas placas de cultura (**Figura 13**), foi adicionado o respetivo volume da solução de GTE po. Por fim, a solução *stock* foi conservada a -20°C, em ambiente devidamente protegido da luz, sendo as soluções que servem de base aos estímulos diários aliquotadas em *eppendorfs* estéreis, para acondicionamento no frigorífico a 4°C.



**Figura 13** - Esquema exemplificativo do desenho experimental de 1 ensaio *in vitro* para um protocolo terapêutico clínico. De acordo com a distribuição, são estudados os agentes quimioterapêuticos isoladamente (A e B), em conjunto (A+B) e associados ao agente coadjuvante natural em estudo – GTE po (A + GTE (0,5 - 5 - 10 µg/ml); B + GTE (0,5 - 5 - 10 µg/ml); A+B + GTE (0,5 - 5 - 10 µg/ml));

### 3.3.3. Teste de viabilidade celular – MTT

A redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um ensaio colorimétrico de medição da viabilidade celular amplamente utilizado em investigação, encontrando-se referenciado em centenas de publicações científicas [72]. Este teste sustenta-se na avaliação da atividade metabólica das células, que permite inferir acerca da sua viabilidade. Isto é, as células metabolicamente ativas, e, por conseguinte, viáveis, são capazes de reduzir os sais de MTT hidrossolúveis (cor amarela) no produto de *formazan* - cristais de E,-Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (de cor azul-escuro/roxa) [72]. Este processo é realizado pelas mitocôndrias, sendo os cristais de *formazan* acumulados no interior da célula, na forma de um precipitado insolúvel [72]. Por outro lado, as células mortas não apresentam atividade mitocondrial, pelo que não conseguem converter o MTT em cristais de *formazan*. A viabilidade celular é, desta forma, determinada na proporção de cor azul-escuro/roxa presente em cada poço, a partir da leitura da respetiva absorvância.

A metodologia supramencionada foi adotada para avaliar o efeito citotóxico dos diferentes agentes quimioterapêuticos, considerados nos ensaios *in vitro*, de forma simples ou combinada com o *Green Tea Extract powder* em estudo. Como tal, após serem respeitados os contornos do ensaio *in vitro* (3.3.2), dentro da câmara de fluxo laminar e mantendo-se todas as condições de assepsia, é descartado o meio de cultura presente em cada poço, sendo, de seguida, adicionado novo DMEM não suplementado num volume igual a 450 µl. Numa fase subsequente, são pipetados 50 µl de MTT a 10% (Sigma, M2128, EUA) em cada poço, para posterior incubação durante 4 h (segundo as condições supradescritas). Findo o período de incubação, é novamente removido o meio de cultura, que depois é substituído por 500 µl de isopropanol ácido<sup>4</sup> - preparado no laboratório a partir da diluição de ácido clorídrico a 37% (Sigma Aldrich®, 7647-01-0, EUA) em isopropanol (Sigma Aldrich®, 200-661-7, EUA). Assim, as placas de cultura foram protegidas da luz, durante 15 min, para que, de seguida, fosse possível a medição da absorvância da solução, com recurso a um

<sup>4</sup> Isopropanol ácido: reagente promotor da destruição da membrana das células viáveis, sendo necessário à solubilização dos cristais de *formazan*, para posterior leitura no espetrofotómetro.

espectrofotômetro (BioTek®, Synergy™ HT, EUA), acoplado a um computador através da interfase Gen5 BioTek®, nos comprimentos de onda de referência: 570 nm e 620 nm (considerando que o pico máximo de absorvância do *formazan* se situa num valor próximo dos 570 nm). Os resultados obtidos, diretamente proporcionais à viabilidade celular, são sujeitos a um adequado tratamento estatístico, tal como é explorado ao longo do capítulo 4.

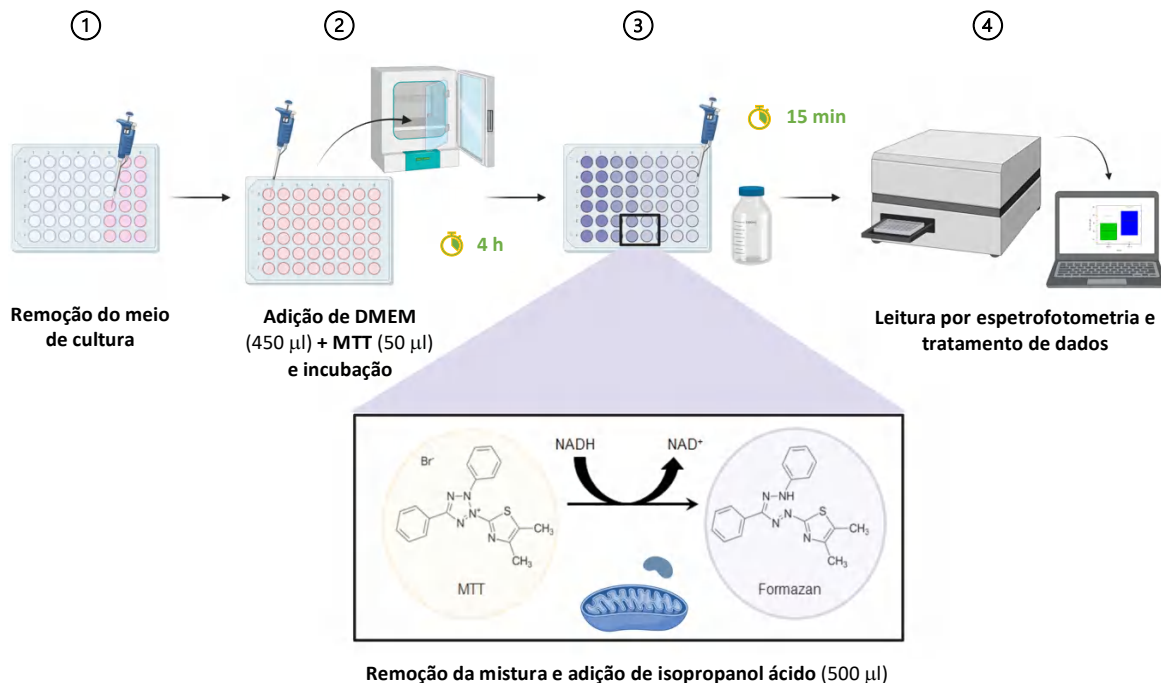


Figura 14 – Esquema da metodologia que serve de base à medição da viabilidade celular.

### 3.4. Ensaios *in vivo*

A progressão da investigação contemporânea na área da biomedicina envolve a experimentação em animais de laboratório, considerando a importância do conhecimento causa efeito na complexidade de um sistema biológico. A mesma razão sustenta o recurso ao estudo *in vivo*, no desenvolvimento da presente dissertação, dada a relevância de se compreender a resposta do organismo à associação do agente coadjuvante natural em estudo com os diferentes quimiofármacos utilizados na prática clínica e testados nos ensaios *in vitro* no âmbito deste projeto (3.3). Neste sentido, o modelo animal utilizado e que será caracterizado secção 3.4.1. viabilizou a indução do tumor primário da mama, assim como da sua forma metastática óssea, com base na linha celular MCF-7. O modelo em questão permitiu ainda a execução de ensaios terapêuticos (3.4.1.3), tendo a sua monitorização sido garantida pelos estudos imagiológicos (3.4.2).

Atendendo ao dilema ético associado à utilização de modelos animais na investigação científica, dada a consciência da sua sensação de dor e sofrimento, foi utilizada anestesia, cumpridos todos os *human-endpoints*, bem como o Princípio dos 3R's, tal como regulamenta a legislação atualmente em vigor. Assim sendo, é fulcral promover-se a Substituição (do inglês: *Replacement*) de procedimentos de experimentação por alternativas que não impliquem o uso de animais, a Redução do número de animais utilizados e o Refinamento de métodos com o objetivo de diminuir o sofrimento e de proporcionar o máximo bem-estar a todos os seres vivos envolvidos.

Desta forma, o iCBR-FMUC possui um biotério (*Vivarium*) certificado, cujas instalações se encontram organizadas, funcional e espacialmente, de forma a garantir a criação e a manutenção de animais dentro dos padrões de higiene, qualidade microbiológica e segurança necessários. Como tal, os animais foram mantidos num ambiente controlado: temperatura entre os 24-28°C, humidade relativa do ar a 40-60%, ciclos de luz e ruído verificados, gaiolas desinfetadas e com ambiente enriquecido, água *ad libitum* e ração esterilizada.

Todos os protocolos e procedimentos foram executados de acordo com a devida legislação em vigor, Decreto-Lei 113/2013, e com o Órgão de Bem-Estar Animal do iCBR (ORBEA 17/2015 e 12/2021).

### 3.4.1. Modelo Animal

Ao longo dos últimos anos, a investigação científica tem permitido compreender que os resultados obtidos a partir do estudo de substâncias e fármacos anticancerígenos *in vitro* não são diretamente transponíveis para as condições nas quais os tumores se desenvolvem no Homem. O principal motivo para este comportamento prende-se com a ausência de um microambiente tumoral adequado, que é comum quer ao desenvolvimento, quer à interação do tumor aquando do seu crescimento [73]. Assim, processos como a neovascularização e a ativação do sistema imunitário podem, muitas vezes, ser determinantes para a ação farmacológica. Como tal, é cada vez mais acentuada a relevância do recurso a modelos *in vivo* nos ensaios pré-clínicos, como forma de aproximar as condições em que se desenvolve o estudo à situação clínica do organismo humano [73].

Para a progressão da presente dissertação foi selecionado o murganho da estirpe Balb/c *nude*, um dos modelos animais mais citados em publicações científicas, sendo reconhecido como uma das ferramentas mais importantes na investigação direcionada para o cancro [74]. O genótipo destes animais revela uma mutação espontânea de perda de função ao nível do gene FoxN1 (*Forkhead box*), localizado no cromossoma 11, que traduz uma proteína fundamental ao desenvolvimento da pele, cabelo, unhas e sistema imunitário. Simultaneamente, a proteína FoxN1 desempenha um papel crítico na formação do timo e, por conseguinte, na diferenciação e aquisição de funcionalidade das células T [73]. Neste contexto, selecionaram-se animais Balb/c *nude* pois apresentam inibição do sistema imunitário, com uma redução significativa nas células T ativas, pelo que são incapazes de desenvolver uma panóplia de respostas imunitárias, nomeadamente: a formação de anticorpos e a indução de apoptose de células T malignas ou infetadas por vírus [74].

Desta forma, a imunodeficiência dos animais Balb/c *nude* viabiliza a indução de diferentes tipos de cancro, tendo um tumor maligno humano sido induzido subcutaneamente (s.c.), pela primeira vez, em 1969 [74]. O tumor induzido, com sucesso, teve a sua origem nas células cancerígenas de um doente diagnosticado com doença oncológica do cólon, motivando a sua crescente utilização em estudos na área da Oncologia.

Todas as características supramencionadas sustentam a escolha dos animais Balb/c *nude* como modelo para a indução tumoral primária (3.4.1.1) e metastática da mama (3.4.1.2), no presente estudo, tendo-se selecionado apenas fêmeas, numa amostra total de 2, com 4-6 meses de idade. É de notar que cada uma delas funcionou como seu próprio controlo negativo - antes da indução tumoral - e positivo - após o desenvolvimento cancerígeno. Foram ainda realizados 2 estudos controlo: 1 basal, referente ao animal sem tumor com administração de GTE po e 1 positivo para o desenvolvimento metastático no osso.

#### 3.4.1.1. Modelo de tumor primário da mama

Tendo por base a execução prévia da metodologia de dissociação celular e contagem de células, segundo as condições mencionadas em 3.2.4 e 3.2.5, procedeu-se à preparação de uma seringa de 1 ml (*Pic Solution Syringe*, U-100 insulina, 1608022, Itália) acoplada a uma agulha de 25G (*Pic Solution*, 0,5×16mm, 25 G<sup>5/8</sup>”, 1811371, Itália) com, aproximadamente, 0,2 ml da suspensão celular obtida. Desta forma, em conformidade com a literatura e com a experiência da equipa de investigação, foram inoculadas, em cada animal, 5 - 6 × 10<sup>6</sup> células MCF-7, adotando-se o procedimento abaixo descrito.

Em ambiente calmo e controlado, tendo garantido a limpeza e esterilização da área reservada à manipulação, o animal é devidamente acomodado, sendo posicionado em decúbito lateral. A injeção da suspensão celular, preparada de acordo com os requisitos supramencionados, foi realizada subcutaneamente na coxa direita do animal - modelo não-ortotópico<sup>5</sup>, inserindo a agulha de cima para baixo, com o bisel voltado para cima. Posteriormente, o animal foi identificado e alojado numa gaiola, inserida em *racks* ligadas a um sistema de filtração de entrada e saída de ar, temperatura, humidade e luminosidade controladas.

É de notar que, tal como descrito em (3.1), a linhagem de células MCF-7 se caracteriza pela presença de recetores de estrogénio, motivo pelo qual o desenvolvimento tumoral está dependente da disponibilidade

---

<sup>5</sup> Modelo não-ortotópico: inoculação da suspensão celular num local distinto da origem primária do tumor.

desta hormona. Neste sentido, foi preparada uma emulsão de  $17\beta$ -estradiol (*Estrofem*<sup>®</sup>, 2 mg, ISDIN, Portugal) em óleo de sésamo<sup>6</sup> (Sigma, S3547, EUA), numa concentração de 0,5 mg/ml [75]. Desta emulsão, homogeneizada por vortexação (*Unimag ZX3 Vortex Mixer*, D-82152, Alemanha), foram injetados 0,25 ml, subcutaneamente, na região dorsal superior da fêmeas Balb/c *nude*, uma semana após a inoculação celular que serviu de base ao desenvolvimento do modelo de tumor maligno primário da mama.

### 3.4.1.2. Modelo de tumor metastático da mama

No modelo de indução de metástases ósseas de cancro da mama, usando igualmente células MCF-7, foram respeitadas as condições de preparação da suspensão celular a injetar e da sua inoculação, descritas para o modelo de tumor primário da mama (3.4.1.1).

Considerando que a indução do presente modelo carece de uma intervenção mais invasiva, o animal é previamente anestesiado, usando o procedimento descrito em 3.4.2.2, de forma a assegurar o fundamental bem-estar animal. Após uma avaliação positiva da profundidade anestésica, a fêmea Balb/c *nude* é acomodada e posicionada em decúbito ventral. Insere-se a agulha 25G (acoplada à seringa contendo a suspensão celular) sob a pele da cabeça, com o bisel virado para baixo, para efetuar uma ligeira escarificação na calote craniana, sensivelmente ao nível do topo do osso occipital, numa região próxima da sutura lambdoide. De seguida, a suspensão celular é imediatamente injetada, pretendendo-se que o crescimento das células inoculadas ocorra na região da escarificação, ou seja, que ocorra invasão do osso do crânio por parte destas células. Confirmando-se a ambicionada proliferação celular neste espaço, obtém-se uma simulação do processo de metastização óssea. O procedimento culmina com a recolocação de cada uma das fêmeas Balb/c *nude*, que integram o desenvolvimento do modelo de tumor metastático da mama, na sua gaiola, após o recobro anestésico e a sua necessária identificação.

Sendo as células inoculadas da linha MCF-7, efetua-se igualmente a administração de uma dose da emulsão de  $17\beta$ -estradiol em óleo de sésamo, nas condições enumeradas em 3.4.1.1.

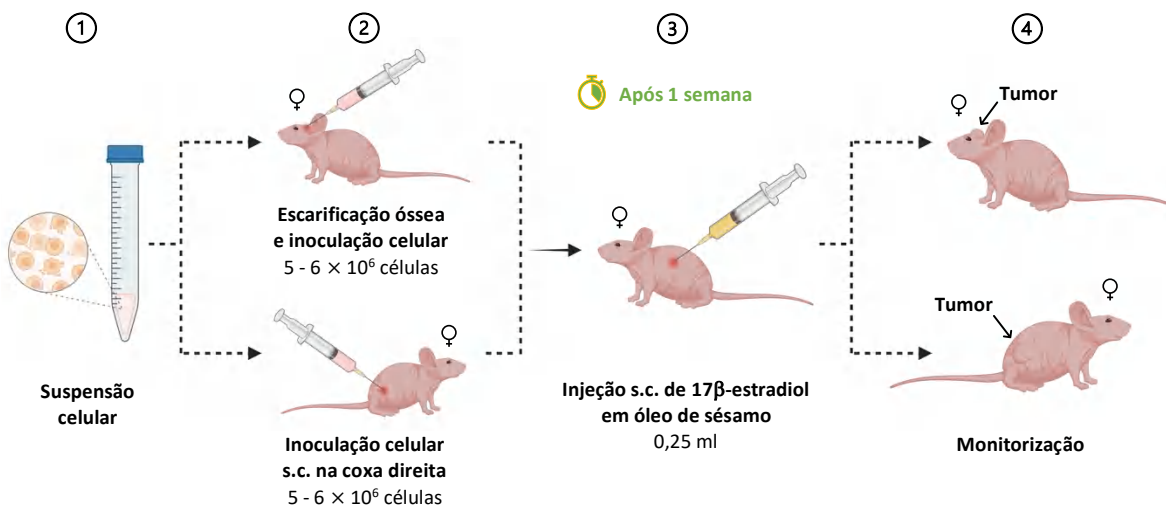


Figura 15 – Processo ilustrativo do desenvolvimento do modelo animal de tumor primário da mama e de tumor metastático da mama.

### 3.4.1.3. Ensaio terapêutico

Cada uma das fêmeas Balb/c *nude*, após a inoculação celular, foi sujeita a um constante acompanhamento. Neste sentido, foi medida e registada a sua massa com recurso a uma balança digital

<sup>6</sup> Óleo de sésamo: veículo utilizado para a administração de  $17\beta$ -estradiol, que permite a libertação desta hormona, de forma lenta e progressiva, ao longo do plano de estudo.



concebida para animais (Seca, modelo 734, série 1/1, Alemanha), assim como verificado e fotografado o local da inoculação tumoral, com uma frequência de 3 a 4 dias. Em caso de identificação de desenvolvimento da massa tumoral a olho nu, foi imediatamente iniciada a sua medição, respeitando-se a frequência anteriormente referida, com uma craveira digital (*Wurth, stainless hardened*, Alemanha). A terapêutica, selecionada consoante os resultados mais promissores dos ensaios *in vitro*, concretizados até à data, foi iniciada quando as dimensões externas eram de cerca de 2 mm ou quando se identificou o seu desenvolvimento através do estudo imagiológico (3.4.2). Transpôs-se, assim, o protocolo clínico humano escolhido para o modelo animal, obedecendo aos intervalos entre os ciclos terapêuticos, após cálculo da dosagem de fármaco a administrar. Para a administração, foi definida a via intraperitoneal (i.p.) como via de absorção, pois o mesmo animal é sujeito a este procedimento repetidas vezes, o que, nesta espécie animal, exclui a via intravenosa (i.v.). A via i.p. tem uma velocidade de absorção semelhante à via i.v..

Considerando a associação estudada *in vitro* entre o GTE po e os diferentes fármacos que integram protocolos terapêuticos utilizados na clínica (3.3.2), foi necessário o ajuste da dosagem e a preparação deste agente coadjuvante natural ao modelo animal. Preparou-se uma solução de *Green Tea Extract powder* em água corrente (pH 3,5-5) com uma concentração de 0,046 g/ml, que foi homogeneizada por vortexação, alíquotada em *ependorfs* e armazenada no frigorífico a 4°C protegida da luz. A administração desta solução de GTE po aos animais em tratamento foi realizada diariamente<sup>7</sup> por gavagem, através de um *abocath* flexível (*BD Insyte™ Autoguard™ Blood Control*, 381034, 20G × 1,16 pol., 1,1 mm × 30 mm), acoplado a uma seringa de 1 ml. O animal é contido, garantindo-se a extensão do pescoço, através da apreensão pela pele solta na região do pescoço, sempre num ambiente controlado e dotado de todos os requisitos essenciais ao bem-estar animal. O *abocath* é cuidadosamente introduzido pelo lado esquerdo da boca do animal, por detrás da língua, até ao esófago. Uma vez garantido o seu correto posicionamento, de forma a evitar possíveis lesões na região laringofaríngea, é administrada a solução. O resumo das terapêuticas estudadas, ao longo do presente ensaio, mostra-se na **Tabela 4** – para ambos os modelos.

**Tabela 4** - Descrição dos protocolos aplicados ao modelo animal de tumor primário da mama (a rosa) e ao modelo de tumor metastático da mama (a amarelo), baseados nos protocolos clínicos previamente estudados nos ensaios *in vitro*. A dosagem ajustada foi calculada com base na concentração dos fármacos cedidos pelo CHUC, bem como na massa e área estimada do animal (60 cm<sup>2</sup>).

	Protocolo terapêutico	Dosagem ajustada	Frequência de administração	Dimensão da amostra
Grupo	<u>Docetaxel</u> (88 mg/m <sup>2</sup> ) +	<u>Doce</u> : 26,5 × 10 <sup>-3</sup> ml/adm. +	<u>Doce</u> : ciclos de 21 dias +	1 animal
	<u>GTE po</u> (0,55 mg/g)	<u>GTE po</u> : 0,3 ml/adm.	<u>GTE po</u> : diariamente	
Intervenção	<u>Vincristina</u> (2 mg/m <sup>2</sup> ) +	<u>Vin</u> : 12 × 10 <sup>-3</sup> ml/adm. +	<u>Vin</u> : ciclos de 21 dias +	1 animal
	<u>GTE po</u> (0,55 mg/g)	<u>GTE po</u> : 0,3 ml/adm.	<u>GTE po</u> : diariamente	

Estudos recentes reportados na literatura indicam que o recurso à suplementação dietética em mulheres diagnosticadas com neoplasia maligna da mama varia entre 67% a 87%. Assim, foi administrado um suplemento vitamínico (integrando ácido fólico e vitamina B12), cálcio e magnésio, a todos os animais em estudo [76]. Este procedimento, para além de mimetizar a terapêutica adotada em contexto clínico, pretende reduzir os efeitos colaterais e a toxicidade dos agentes quimioterapêuticos, melhorando a qualidade de vida dos animais. A suplementação é efetuada 2 vezes por semana, sendo dissolvida na solução de GTE po e administrada, em simultâneo, por gavagem.

É fundamental destacar-se que, como resultado da constante monitorização dos animais em estudo, sempre que um tumor apresentou as dimensões máximas regulamentadas (*human endpoints*). Assim, garantindo-se a ausência de *stress* e sofrimento, não compatíveis com o bem-estar animal, procedeu-se à sua ocisão, por *overdose* anestésica. Posteriormente, foi exposta a zona de indução do tumor, fotografada e colhida uma amostra, convenientemente fixada em formol neutro tamponado a 10% (AppliChem Panreac, 1430091.1214, Espanha), para consecutivo estudo histológico (3.5).

<sup>7</sup> O volume (0,3 ml) e a quantidade ideal (0,55 mg/g) foram determinados em estudos prévios executados pelo grupo de investigação.

### 3.4.2. Estudo Imagiológico

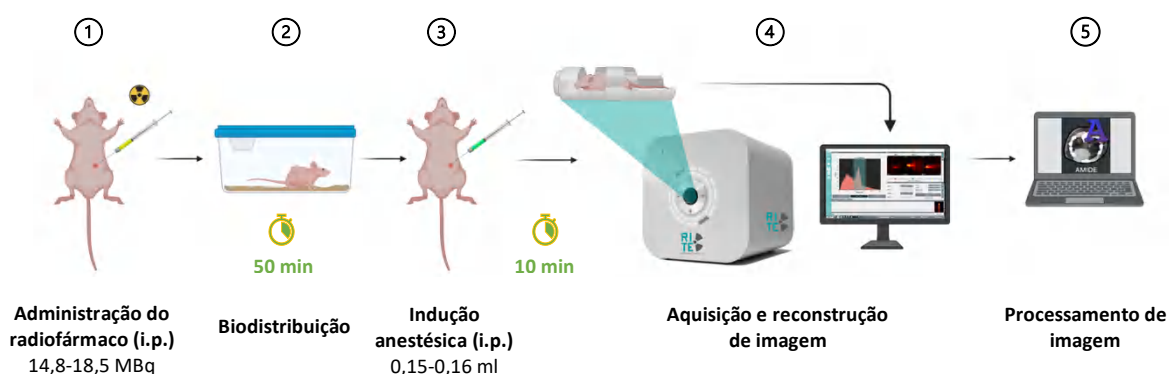
Todos os animais em estudo foram submetidos a uma monitorização imagiológica, de carácter semanal, ao longo do tempo. O protocolo relativo à aquisição de imagem, ilustrado pela **Figura 9**, foi executado usando o sistema *easyPET.3D* (*easyPET*, RI-TE, Portugal), caracterizado em **2.4.2**, mantendo os animais o jejum nas 6 ou 7 h que antecedem o procedimento.

O estudo de imagem funcional tem início com a administração do radiofármaco (**3.4.2.1.**), cedido pelo CHUC e transportando até ao iCBR-FMUC corretamente acondicionado num transportador de seringas de chumbo (*Protector Shield Biodex*, EUA), respeitando-se as normas de segurança definidas em Radiofarmácia. É ainda de destacar que todas as instalações e equipamentos utilizados se encontram devidamente certificados pelo Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN). A exposição à radiação ionizante foi monitorizada através do dosímetro individual do operador e de um contador Geiger-Müller.

A preparação da dose de radiofármaco a injetar no animal pressupõe a sua manipulação no interior de uma *hot cell* (*Medisystem, Medi 9000 4R LME*, 11915), sendo colocada numa seringa de 1 ml, acoplada a uma agulha de 25G, e medida num calibrador de dose (*CRC<sup>®</sup>-15 W, Capintec*, EUA). O valor, associado à referente hora de medição, deve ser registado para posterior processamento. A dose de radiofármaco a administrar a cada animal, via i.p., variou entre 14,8 - 18,5 MBq, tendo por base estudos de radiotoxicidade realizados previamente pela equipa de investigação a estirpe, a massa corporal e características do sistema *easyPET.3D*. Esta administração é efetuada num volume de aproximadamente 0,50-0,65 ml, sendo, quando necessário, diluída com soro fisiológico estéril (Cloreto de Sódio 0,9%, *Labesfal*, Laboratórios Almiro S.A, Portugal). Recorrendo novamente ao calibrador de dose, é medida e anotada a atividade remanescente na seringa, assim como a respetiva hora de medição.

Considerando os mecanismos celulares de captação da radioatividade, é fundamental o cumprimento do tempo de biodistribuição (duração de aproximadamente 1 hora, no decorrer do presente estudo). É de salientar que o protocolo adotado prevê que o animal seja anestesiado 10 min antes da aquisição de imagem, pelo que, ao fim de 50 min de biodistribuição, se procede à administração i.p. de 0,15 – 0,20 ml da mistura anestésica (**3.4.2.2.**). Após a indução anestésica foi assegurada uma constante monitorização das funções cardiovascular e respiratória do animal, bem como da sua termorregulação, já que os ratinhos Balb/c *nude* apresentam uma predisposição para a perda de calor corporal, com possível evolução para hipotermia.

Após o *terminus* do tempo de biodistribuição, estando o animal no estado de profundidade anestésica adequado, é iniciada a aquisição de imagem: durante um período aproximado de 20 – 30 min, até se completarem cerca de 2 milhões de contagens (**Figura 16**). Os dados em bruto, resultantes da aquisição, são submetidos ao processo de reconstrução, a partir do qual são obtidos os ficheiros de imagem a processar. O processamento de imagem é executado com o auxílio de uma ferramenta de visualização e imagem médica – *software* AMIDE – cujas funcionalidades utilizadas na presente dissertação são exploradas no desenvolvimento do próximo capítulo [77,78].



**Figura 16** – Síntese do protocolo relativo ao processo de aquisição de imagem.

### 3.4.2.1. Radiofármacos

O radiofármaco detém um papel determinante na aquisição de imagens funcionais, apresentando características bioquímicas e estruturais específicas, nomeadamente a presença de um radionuclídeo, a necessidade de submissão a um processo de controlo de qualidade minucioso antes da administração e, ainda, a sua utilização condicionada pelo tempo de meia vida do isótopo radioativo [78]. Desta forma, dado o leque de radiofármacos no mercado, a sua seleção deve cumprir requisitos bem definidos, que se coadunem com a conjugação de um conjunto de características ideais de biodistribuição, farmacodinâmica e farmacocinética. Assim, vários radionuclídeos emissores de positrões associados a moléculas biológicas são utilizados em Medicina Nuclear, tais como o Flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), o Carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ), o Azoto-13 ( $^{13}\text{N}$ ) e o Oxigénio-15 ( $^{15}\text{O}$ ), principalmente pelo facto de se poderem associar a moléculas biológicas. Tendo por base os critérios supramencionados, bem como a adequação do seu tempo de meia vida à aquisição de imagens para avaliação metabólica e funcional (109,8 min), o  $^{18}\text{F}$  tornou-se no emissor de positrões com um espetro de aplicações mais abrangente em Medicina Nuclear [78].

A execução dos ensaios imagiológicos que integram a presente dissertação teve por base a utilização de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG (fluorodesoxiglicose) e o [ $^{18}\text{F}$ ]-NaF (fluoreto de sódio), os quais são explorados de seguida.

#### ⇒ [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG

Atualmente o [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG é o marcador radioativo mais utilizado na aquisição de imagens clínicas PET. Este processo é baseado no princípio de captação aumentada de glucose pelas células cancerígenas, considerando a elevada intensidade do seu metabolismo [78]. A molécula em estudo, glucose em que o grupo hidroxilo (OH) foi substituído por um átomo de Flúor radioativo ( $^{18}\text{F}$ ), é transportada através da membrana celular, para o citoplasma da célula, através de agentes transportadores de glucose (proteínas GLUT-1 a GLUT-7, GLUT-10 a GLUT-12) [79]. Uma vez no interior da célula, a molécula de glucose radioativa [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG sofre a primeira etapa da glicólise, sendo fosforilada pela hexocinase em [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-6-fosfato. Enquanto a glucose-6-fosfato progrediria normalmente na via glicolítica, o [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-6-fosfato, pelas suas características químicas, não pode ser metabolizado. Desta forma, permanece acumulado no interior da célula cancerígena, como um metabolito polar, constituído a base da aquisição das imagens PET com recurso ao [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG. A sua desfosforilação acontece ao longo de várias horas, sendo posteriormente eliminado por via renal [79]. É ainda de notar que a expressão das proteínas GLUT e da hexocinase é maior nas células tumorais malignas, justificando o seu maior consumo energético e, por conseguinte, a maior captação de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG [78].

#### ⇒ [ $^{18}\text{F}$ ]-NaF

O fluoreto de sódio ([ $^{18}\text{F}$ ]-NaF), também marcado com Flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), permite o estudo imagiológico do esqueleto, sendo fundamental para a identificação e quantificação de alterações na estrutura óssea, com base no mapeamento do seu metabolismo [80].

O mecanismo de captação do [ $^{18}\text{F}$ ]-NaF tem início com a sua difusão dos capilares sanguíneos para o tecido ósseo, não se ligando a proteínas plasmáticas [80]. Uma vez neste tecido, os iões fluoreto substituem o grupo hidroxilo dos cristais de hidroxiapatite, dando origem a fluoroapatite radioativa, cuja deposição é realizada nos locais de *turnover* e de remodelação óssea aumentados [81]. Desta forma, uma perturbação no equilíbrio natural existente entre a atividade osteoclástica e osteoblástica pode ter como origem a disseminação de células cancerígenas, o que se traduz numa captação aumentada de [ $^{18}\text{F}$ ]-NaF numa determinada região do osso e, o que, por conseguinte, sustenta o princípio de aquisição de imagem PET.

### 3.4.2.2. Mistura anestésica

A indução anestésica descrita em (3.4.2) tem por base a junção de 2 agentes distintos: cetamina (Cetamina *Hikma* 50 mg/ml, *Hikma* Farmacêutica<sup>TM</sup>, Portugal) e xilazina (*Rompum*<sup>®</sup>, 20 mg/ml, *Bayer*, Portugal).

A cetamina é um fármaco anestésico dissociativo, sendo utilizado para a indução e manutenção da anestesia, uma vez que é o mais potente agente bloqueador dos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA) disponível na clínica [82]. A normal ativação dos recetores NMDA conduz à abertura dos canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ),

devido à libertação de glutamato - neurotransmissor excitatório. É o influxo de  $Ca^{2+}$  que garante a condução do sinal nervoso, pelo que o seu bloqueio se traduz numa inativação neuronal. Desta forma, a cetamina atua ao nível do sistema nervoso central, sendo um antagonista não-competitivo dos canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) [82]. Quer isto dizer que promove a redução da disponibilidade de glutamato, impedindo a abertura destes canais. Assim, a transmissão dos sinais nervosos é comprometida.

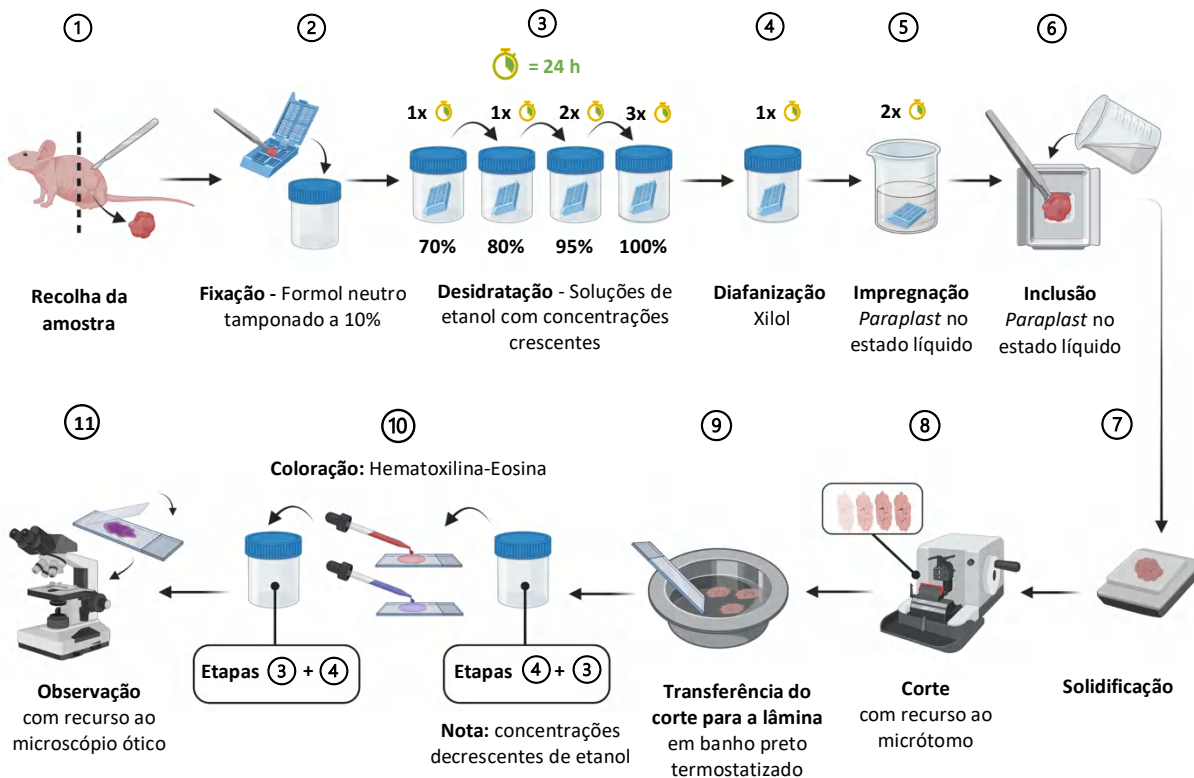
É de salientar que a cetamina produz uma sedação profunda. No entanto, o seu grau de relaxamento muscular que induz pode ser insuficiente para alguns procedimentos, sendo, por este motivo, combinada com outros agentes, nomeadamente a xilazina.

A xilazina é um analgésico amplamente utilizado em Medicina Veterinária e em experimentação animal, nomeadamente como sedativo, relaxante muscular e agente potenciador de outros anestésicos [83]. Dado o seu mecanismo de ação é um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, pois estimula os recetores  $\alpha_2$  pré-sinápticos centrais [84]. A estimulação adrenérgica dos referidos recetores provoca a diminuição da libertação de norepinefrina e dopamina no sistema nervoso central, que se traduz na inibição da transmissão de estímulos neuronais [84]. Desta forma, verifica-se um efeito sedativo, o relaxamento muscular e a diminuição da perceção de dor.

Com base nos vários protocolos de indução anestésica reportados na literatura e no conhecimento dos mecanismos de ação dos agentes supracitados, preparou-se a mistura anestésica em questão numa concentração de 2,5:1:9, respetivamente de cetamina:xilazina:soro fisiológico, para obter um volume final de 1,5 ml (tendo em consideração o período máximo recomendado para a sua conservação sem perda de eficácia) [85]. A mistura anestésica foi administrada ao animal, de acordo com o procedimento descrito (3.4.2).

### 3.5. Ensaios histológicos

As amostras recolhidas aquando da necropsia de cada um dos animais em estudo foram devidamente processadas para técnica histológica de rotina com Hematoxilina-Eosina (H&E), de acordo com a metodologia descrita pela **Figura 17**.



**Figura 17** - Metodologia para processamento histológico de rotina (H&E) e posterior observação.

## 4. Apresentação e Discussão dos Resultados

Este capítulo contempla os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento da presente dissertação, relativamente, aos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados. Destaca-se que, no que concerne aos ensaios *in vitro*, serão discutidos os resultados associados ao teste de viabilidade celular - MTT. Por outro lado, os dados recolhidos no âmbito dos modelos *in vivo* serão estudados com base na análise das imagens adquiridas com o sistema *easyPET.3D* (monitorização longitudinal), assim como das preparações histológicas obtidas.

### 4.1. Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* realizados (3.3.2), com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico dos diferentes agentes quimioterapêuticos considerados, de forma simples ou combinada com o extrato de chá verde em estudo, culminaram na realização do teste de viabilidade celular – MTT (3.3.3). Desta forma, os resultados obtidos, diretamente proporcionais à viabilidade celular, foram submetidos a um adequado tratamento estatístico. Neste sentido, é fundamental reforçar-se que todas as combinações terapêuticas em estudo apresentam o mesmo número de ensaios realizados, tendo cada uma delas sido testada num total de 36 poços de cultura.

O tratamento estatístico dos dados obtidos pressupõe, em primeiro lugar, a sua padronização ao controlo da respetiva caixa de ensaio, como descrito pela **Equação 1**. Assim, torna-se possível o estabelecimento de comparações entre estudos citotóxicos distintos.

$$MTT_{\text{padronizado}} = \frac{MTT}{MTT_{\text{controlo}}} \quad \text{Equação 1}$$

Deste procedimento, resulta a inclusão da designada linha de padronização ( $y = 1$ ) em cada um dos gráficos apresentados ao longo da presente secção. Desta forma, infere-se que, sempre que os valores do  $MTT_{\text{padronizado}}$  forem inferiores à linha em questão ( $MTT_{\text{padronizado}} < 1$ ), o agente terapêutico em análise exibe uma redução da viabilidade das células tumorais. O contrário ( $MTT_{\text{padronizado}} \geq 1$ ) revela a inexistência de qualquer efeito citotóxico. O cumprimento deste requisito permite a consecutiva aplicação dos testes estatísticos selecionados – testes não-paramétricos (com recurso ao *software RStudio*), tendo por base a natureza dos dados recolhidos.

Neste sentido, o primeiro teste estatístico executado – Teste de *Kruskal-Wallis* - teve como objetivo a avaliação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre as medianas de 3 ou mais amostras (grupos) independentes. Desta forma, o teste em questão assume como hipótese nula a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos grupos em estudo. Considerando que a significância definida para a presente análise assume um valor de  $\alpha = 0,05$  (intervalo de confiança igual a 95%), sempre que, após a realização do teste estatístico, for obtido um valor de  $p < \alpha$ , rejeita-se a hipótese nula associada ao teste em execução. Quer isto dizer que, no caso de se verificar a condição anterior, aquando da realização do Teste de *Kruskal-Wallis*, a hipótese nula é rejeitada e assume-se como verdadeira a hipótese alternativa, ou seja, existem diferenças estatisticamente significativas na mediana de pelo menos uma das amostras em estudo.

Por outro lado, a determinação da existência de diferenças estatisticamente significativas, concretamente entre a mediana de 2 amostras independentes, é garantida pela aplicação do Teste de Mann-Whitney. Este assume como hipótese nula que as medianas das 2 amostras em análise não apresentam diferenças estatisticamente significativas, pelo que, à semelhança do explicado para o Teste de *Kruskal-Wallis*, a validação da condição  $p < \alpha$  ( $\alpha = 0,05$ ), conduz à sua rejeição.

Tendo por base a aplicação dos testes estatísticos supramencionados, assim como a representação dos dados obtidos em diagramas de extremos e quartis, foi possível avaliar o potencial adjuvante do extrato de chá verde (*Green Tea Extract powder – MyProtein®*), quando combinado com agentes quimioterapêuticos utilizados, atualmente, em contexto clínico. De seguida, são apresentados os diagramas em questão, sendo realizada a respetiva análise gráfica e interpretação detalhada dos resultados obtidos.

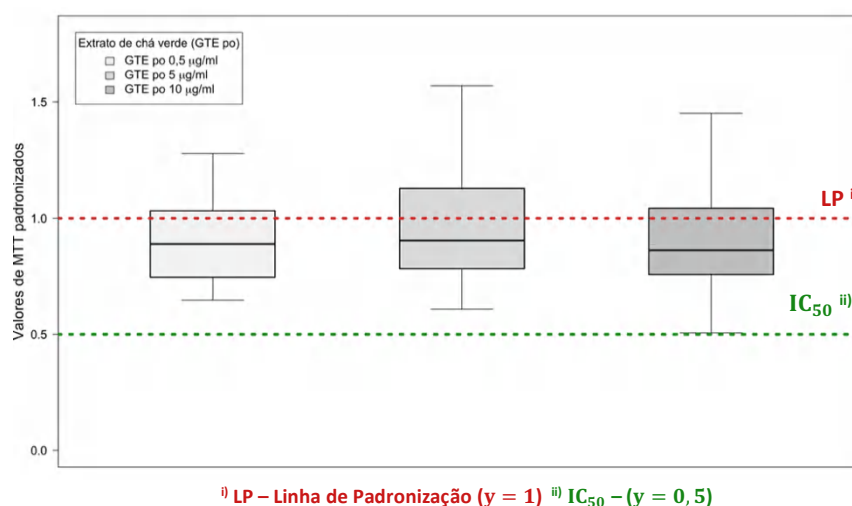
Torna-se importante destacar que, para além da linha de padronização, os gráficos apresentados integram a linha representativa do parâmetro  $IC_{50}$  ( $y = 0,5$ ), o qual está relacionado com a capacidade de

um determinado fármaco ou combinação terapêutica induzir a morte de 50% das células em estudo. Assim sendo, quando se verificam valores de  $MTT_{padronizado}$  inferiores à linha em questão ( $MTT_{padronizado} < 0,5$ ), infere-se que o agente terapêutico apresenta efeito citotóxico capaz de conduzir à morte de mais de 50% das células cancerígenas. Adicionalmente, é de salientar a adoção de uma nomenclatura relativa à representação gráfica da presença de significância estatística para as amostras em estudo. Neste sentido, os caracteres \*, \*\* e \*\*\*, incluídos nos gráficos das figuras que se seguem, identificam as terapêuticas onde se verificam, respetivamente, as condições  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , traduzindo a presença de diferenças estatisticamente significativas.

#### ⇒ Extrato de chá verde (GTE po – MyProtein®)

A **Figura 18** é referente ao primeiro ensaio *in vitro* realizado, através do qual se pretendeu avaliar a ação antineoplásica do extrato de chá verde (GTE po). As diferentes concentrações deste composto natural em estudo foram testadas, isoladamente, nas células MCF-7 ( $7,2 \times 10^3$  células/poço).

A aplicação do Teste de *Kruskal-Wallis* permite inferir que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as 3 concentrações de GTE po em estudo, já que  $p = 0,7493$ . Desta forma, para se perceber se existe poder citotóxico do GTE po, foi aplicado um Teste Binomial, tendo-se assumido como sucesso a capacidade deste composto reduzir a viabilidade celular ( $MTT_{padronizado} < 1$ ) e como insucesso a ausência de efeito citotóxico por parte do GTE po ( $MTT_{padronizado} \geq 1$ ). Esta análise comprova que o GTE po exibe ação terapêutica, com uma probabilidade de sucesso de 66%. Esta ação pode ser justificada pelas características intrínsecas deste composto natural, nomeadamente, a presença de catequinas e flavonóides, que lhe conferem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimutagénicas, as quais são fundamentais para a inibição da progressão tumoral, tal como exposto em (2.5.2).



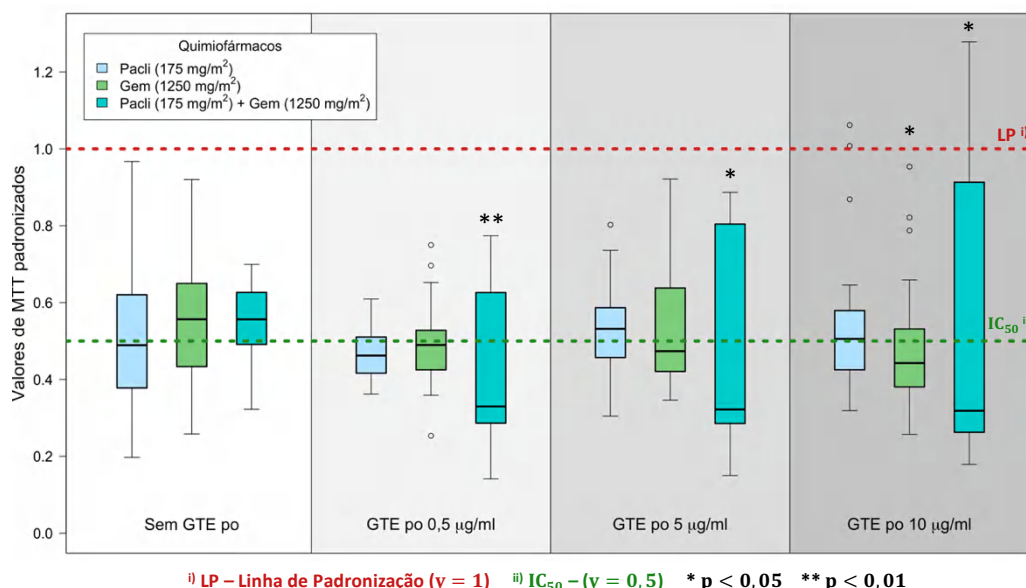
**Figura 18** - Diagrama de extremos e quartis para os resultados de MTT obtidos nos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico isolado do GTE po MyProtein® (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

#### ⇒ Protocolo: Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina (1 250 mg/m<sup>2</sup>)

A **Figura 19** é relativa aos resultados *in vitro* associados à avaliação do efeito citotóxico do protocolo clínico composto pelos agentes quimioterapêuticos Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) e Gemcitabina (1 250 mg/m<sup>2</sup>), aplicados isoladamente e em associação ao GTE po em estudo, nas células MCF-7. Desta forma, a análise do diagrama de extremos e quartis permite inferir que o Paclitaxel apresenta um aumento do seu potencial citotóxico, quando combinado com a menor concentração de GTE po testada. Por outro lado, a sua associação com concentrações progressivamente mais elevadas do composto natural torna-o menos eficaz na redução da viabilidade das células neoplásicas. Contudo, nenhuma das alterações identificadas é estatisticamente significativa comparativamente com a ação isolada do Paclitaxel.

No que concerne à Gemcitabina é claramente visível a redução da mediana dos valores de  $MTT_{padronizado}$  quando esta é combinada com as distintas concentrações do extrato de chá verde. Quer isto dizer que, a Gemcitabina apresenta um aumento da sua citotoxicidade quando associada a cada uma das três concentrações de GTE po testadas, induzindo, em todos os casos, a morte a mais de 50% das células neoplásicas. É de notar que este comportamento apresenta significância estatística para a associação da Gemcitabina ao GTE po com uma concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,0232$ ).

Por último, a ação combinada dos dois agentes quimioterapêuticos (como clinicamente protocolado) apresenta diferenças estatisticamente significativas quando articulada com o GTE po, em todas as concentrações testadas. Assim, verifica-se que o extrato de chá verde em estudo aumenta, significativamente, o poder citotóxico do protocolo clínico considerado. Esta tendência pode estar relacionada com a conjugação dos mecanismos de ação dos fármacos considerados com as propriedades do GTE po. Desta forma, considerando que a Gemcitabina e o Paclitaxel conduzem ao bloqueio das células cancerígenas nas fases S/G2 e G1 (2.5.1), respetivamente, o GTE po poderá desempenhar uma ação adjuvante, já que é inespecífico para as diferentes fases do ciclo celular. Neste sentido, e uma vez que todas as fases do ciclo celular são bloqueadas, pode inferir-se que o GTE po potencia a ação farmacológica da combinação dos agentes terapêuticos em estudo.



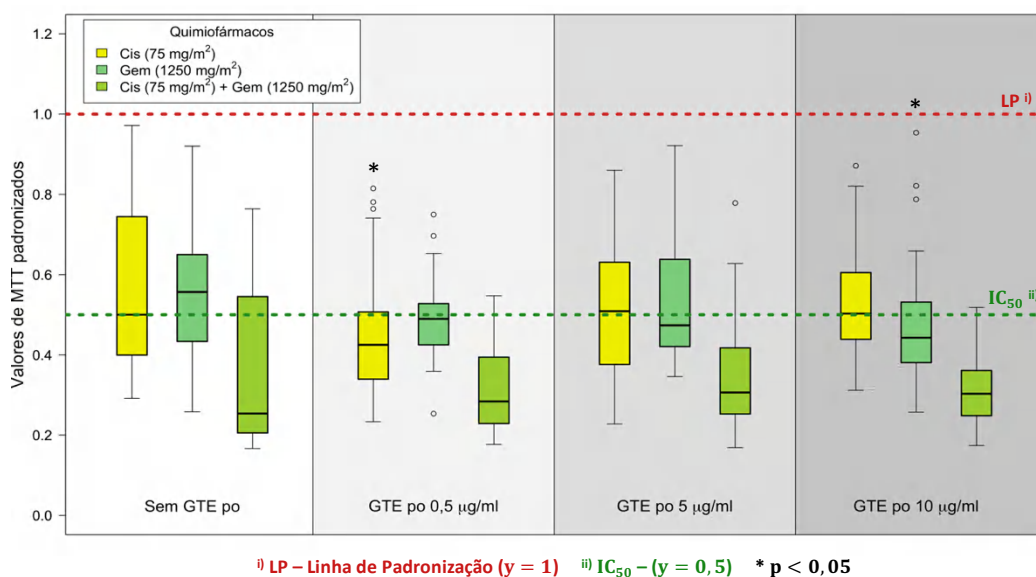
**Figura 19** – Diagrama de extremos e quartil relativo aos resultados de MTT obtidos nos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico dos agentes terapêuticos Paclitaxel (Pacli) (175 mg/m<sup>2</sup>), Gemcitabina (Gem) (1 250 mg/m<sup>2</sup>) e Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina (1250 mg/m<sup>2</sup>). Estes foram estudados isoladamente e em combinação com diferentes concentrações de GTE po *MyProtein*<sup>®</sup> (0,5 – 5 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ).

⇒ **Protocolo:** Protocolo: Cisplatina (75 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina (1 250 mg/m<sup>2</sup>)

À semelhança da avaliação realizada para o protocolo anterior, foi testada a ação isolada de cada um dos agentes quimioterapêuticos incluídos no protocolo em análise, bem como a influência da conjugação de GTE po às diferentes concentrações. Neste sentido, a partir da interpretação do diagrama de extremos e quartil da **Figura 20**, é possível constatar que, relativamente à Cisplatina (75 mg/m<sup>2</sup>), a sua ação citotóxica não sofre alterações significativas quando combinada com o extrato de chá verde nas concentrações 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,3889$ ) e 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,8880$ ). No entanto, os valores do  $MTT_{padronizado}$  diminuem, de forma significativa, quando a Cisplatina é aplicada em associação a concentrações mais reduzidas de GTE po, concretamente, a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,0357$ ).

Relativamente à Gemcitabina, mantém-se válida a análise supramencionada, considerando que a sua concentração no presente protocolo não difere da estudada na metodologia de tratamento anterior.

No que concerne à terapêutica protocolada (ação simultânea da Cisplatina e Gemcitabina), identifica-se uma perda de função citotóxica, ainda que não-significativa, quando esta é combinada com qualquer uma das três concentrações de GTE po em estudo. Desta forma, faz sentido inferir que este comportamento estará relacionado com a ação não-adjuvante do extrato de chá verde no mecanismo de ação da Cisplatina, considerando as inferências formuladas aquando da análise da ação isolada deste fármaco com o GTE po. Por outras palavras, apesar de o composto natural em estudo ser capaz de complementar o bloqueio das células tumorais induzido pela cisplatina, em diferentes fases do ciclo celular, estes apresentam um outro mecanismo em aparente conflito de função. Tal como descrito em 2.5.1, a Cisplatina é capaz de promover o *stress* oxidativo, resultando na disfunção de proteínas, inibição da absorção de cálcio e redução do potencial da membrana mitocondrial. Por outro lado, o extrato de chá verde apresenta propriedades antioxidantes, reduzindo o *stress* oxidativo, através da neutralização de ROS. Como tal, a incompatibilidade de função descrita pode estar na origem da ausência de efeito adjuvante do GTE po no presente protocolo.



**Figura 20** - Gráfico de extremos e quartis relativo aos resultados de MTT dos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação da toxicidade dos agentes terapêuticos Cisplatina (Cis) (75 mg/m<sup>2</sup>), Gemcitabina (Gem) (1250 mg/m<sup>2</sup>) e Cisplatina (75 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina (1250 mg/m<sup>2</sup>). Estes foram analisados de forma isolada e em associação a diferentes concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

⇒ **Protocolo:** Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>) + Doxorrubicina (60 mg/m<sup>2</sup>) + Transtuzumab (8 mg/kg)

A **Figura 21** ilustra, em diagramas de extremos e quartis, o efeito citotóxico dos agentes Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>), Doxorrubicina (60 mg/m<sup>2</sup>) e Transtuzumab (8 mg/kg), isolada e conjuntamente, bem como associados ao extrato de chá verde em estudo. Como tal, através da sua análise, é possível identificar que a ação antineoplásica da Ciclofosfamida é praticamente inexistente, quer na sua forma isolada, quer em articulação com o GTE po, uma vez que, em todos os casos, apresenta uma mediana dos valores de MTT<sub>padronizado</sub> próxima de 1. Desta forma, nos ensaios *in vitro* realizados, constata-se que a Ciclofosfamida não induz a redução da viabilidade das células MCF-7, o que pode ser justificado pelo facto de este agente ser definido como um pro-fármaco. Assim sendo, a sua dependência do metabolismo hepático condiciona a obtenção de resultados promissores *in vitro*.

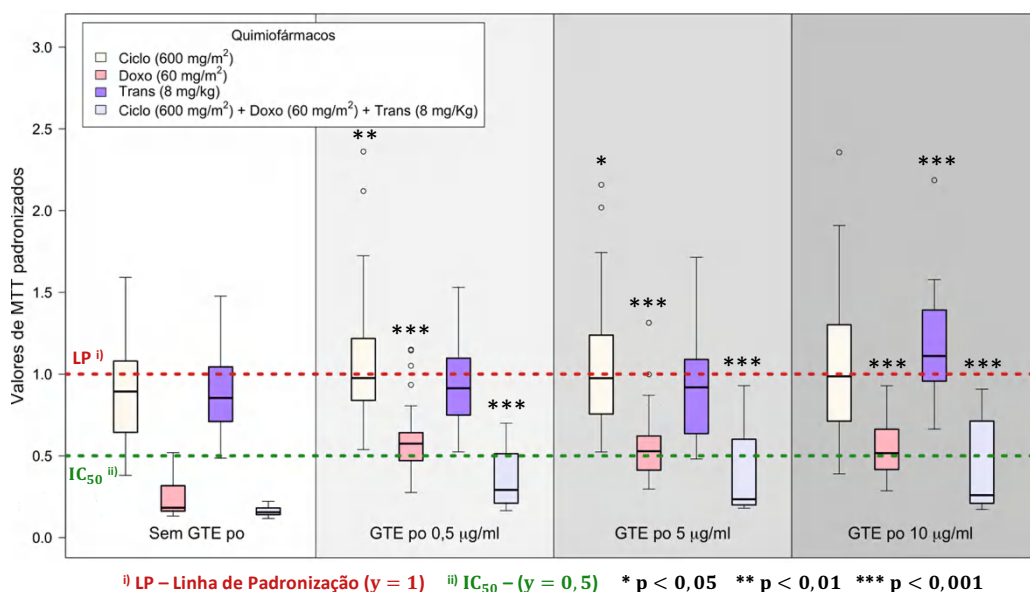
Relativamente à Doxorrubicina, o diagrama de extremos e quartis permite reconhecer uma perda, estatisticamente significativa, da sua ação citotóxica, quando combinada com qualquer uma das três concentrações de GTE po testadas. No entanto, verifica-se que, mesmo com uma redução de eficácia citotóxica, a associação da Doxorrubicina ao composto natural mantém a mediana dos valores MTT<sub>padronizado</sub> próximos da linha do parâmetro IC<sub>50</sub>, revelando que, ainda assim, é capaz de induzir a apoptose de aproximadamente 50% das células MCF-7. A redução em questão do potencial anticancerígeno pode estar associada ao facto de um dos três principais mecanismos de ação da Doxorrubicina passar pela



formação e acumulação de radicais livres, a qual é condicionada pelas propriedades antioxidantes do extrato de chá verde, como descrito em 2.5.1 e em 2.5.2.

Quanto ao Transtuzumab, não se identifica uma redução significativa da viabilidade das células tumorais, nem isoladamente, nem com a sua associação ao GTE po. Este comportamento pode ser justificado pela mecanismo de ação deste anticorpo monoclonal, o qual se liga ao domínio extracelular do HER2, inibindo a sua homodimerização. Considerando as características das células utilizadas nos ensaios *in vitro*, linha celular MCF-7 (3.1), percebe-se que a ação do Transtuzumab pode estar limitada pela ausência de expressão dos recetores HER2 nas células em questão.

Por último, a ação citotóxica do protocolo apresenta um maior impacto na restrição da viabilidade celular das células neoplásicas, comparativamente à sua aplicação conjunta com o composto natural, o que pode estar associado ao efeitos supramencionados. Contudo, a ação citotóxica do protocolo combinado com o GTE po apresenta potencial anticancerígeno, já que a mediana dos valores de  $MTT_{padronizado}$ , para esta combinação, se encontra abaixo da linha que define o parâmetro  $IC_{50}$ .



**Figura 21** - Diagrama de extremos e quartil ilustrativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) dos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação da toxicidade dos agentes terapêuticos Ciclofosfamida (Ciclo) (600 mg/m<sup>2</sup>), Doxorubicina (Doxo) (60 mg/m<sup>2</sup>), Transtuzumab (Trans) (8 mg/Kg) e Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>) + Doxorubicina (60 mg/m<sup>2</sup>) + Transtuzumab (8 mg/Kg). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

⇒ **Protocolo:** Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>)

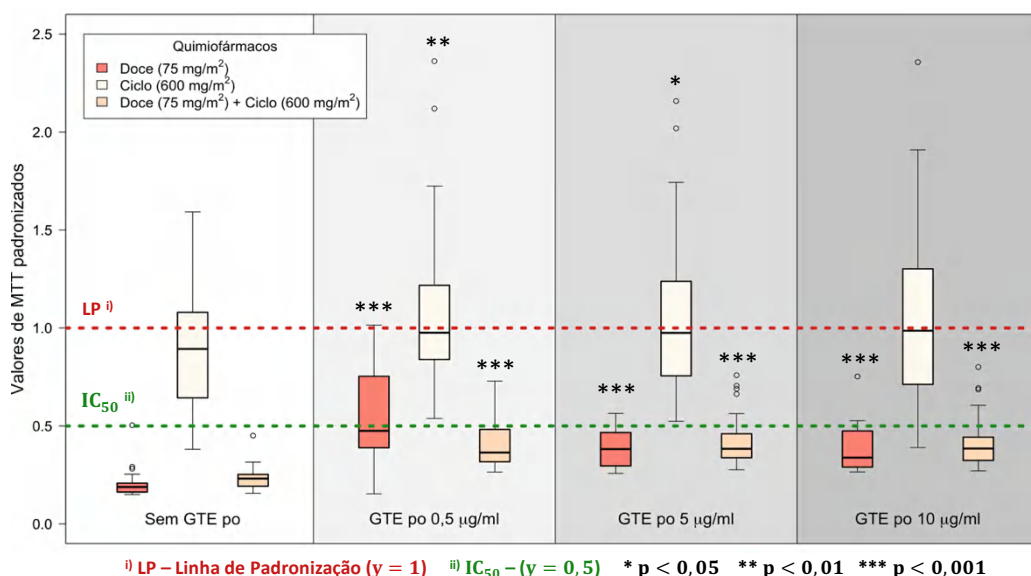
O presente protocolo associa a farmacodinâmica do Docetaxel e da Ciclofosfamida, tendo sido avaliada, como até então, a influência da sua combinação com várias concentrações de GTE po.

Desta forma, a **Figura 22** exhibe uma tendência menos positiva para a associação do GTE pó ao Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>), já que há um aumento da mediana dos valores de  $MTT_{padronizado}$  (diretamente proporcionais à viabilidade celular) quando é realizada *in vitro* esta combinação. Este corresponde a um comportamento estatisticamente significativo, que vai ao encontro do que foi verificado também para o Paclitaxel, o qual exhibe um mecanismo de ação semelhante ao Docetaxel, considerando que tomam a mesma classe – Taxanos.

No gráfico em análise, a ação citotóxica da Ciclofosfamida mantém-se inalterada, comparativamente ao protocolo anteriormente analisado, uma vez que a sua concentração, definida clinicamente, não difere em relação a esse protocolo. Neste sentido, subscreve-se a interpretação tecida.

No que concerne à combinação protocolada dos dois fármacos, e tendo por base a análise efetuada para as suas ações isoladas, percebe-se que o efeito citotóxico verificado pode dever-se, principalmente, à atuação do Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>). A mesma tendência é verificada para qualquer uma das três associações ao GTE po. Assim, apesar de se identificar uma eficácia inferior da combinação farmacológica com o extrato

de chá verde, tal como verificado para a combinação apenas do Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) com o GTE po, é possível constatar, em todas as possibilidades de associação, uma redução da viabilidade celular, numa percentagem superior a 50%.



**Figura 22** - Gráfico de extremos e quartis representativo dos resultados de MTT relativos aos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação do efeito citotóxico dos agentes terapêuticos Docetaxel (Doce) (75 mg/m<sup>2</sup>), Ciclofosfamida (Ciclo) (600 mg/m<sup>2</sup>) e Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

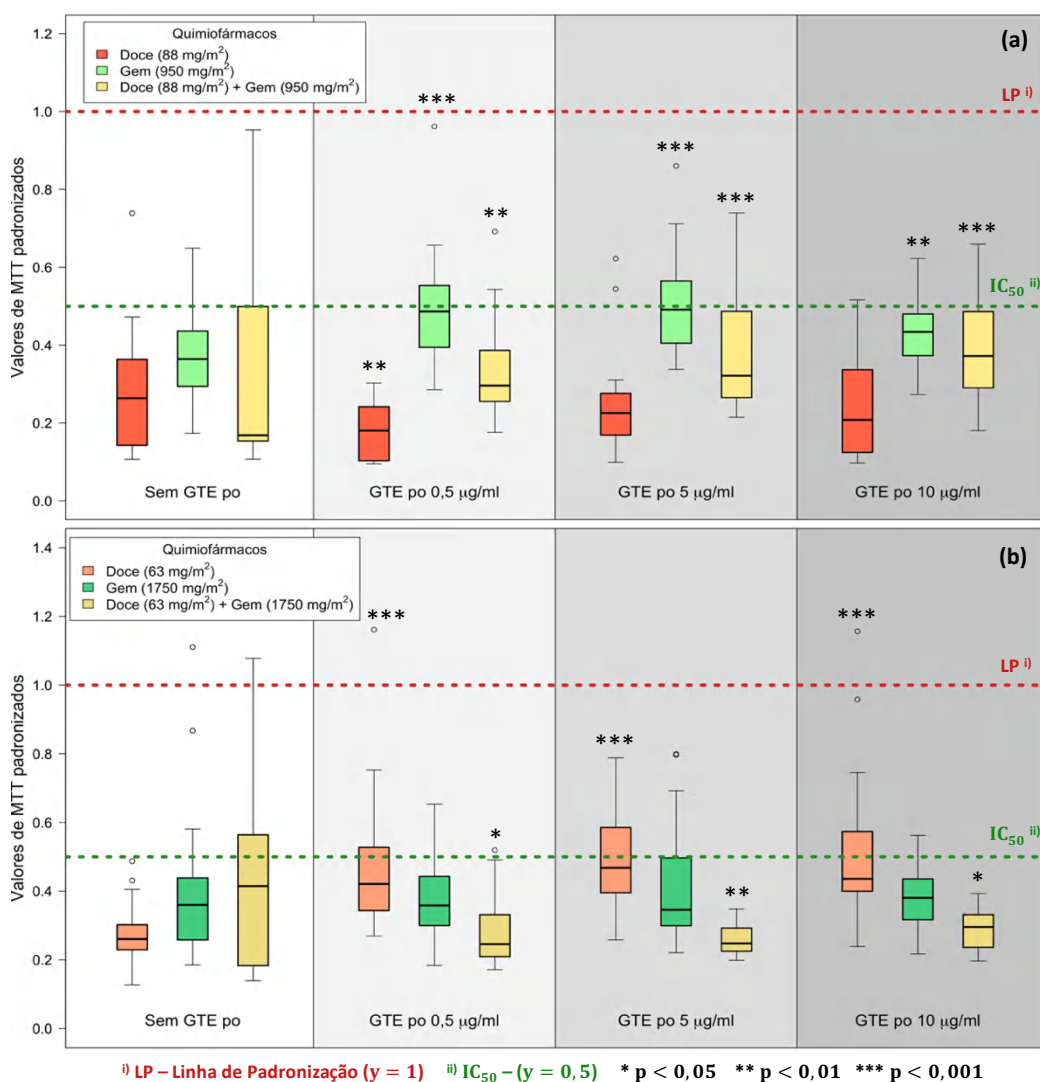
⇒ **Protocolos:** Docetaxel 1 (88 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina 1 (950 mg/m<sup>2</sup>) vs Docetaxel 2 (63 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina 2 (1 750 mg/m<sup>2</sup>)

Tendo por base que dois dos protocolos clínicos selecionados incluem a ação dos mesmos agentes quimioterapêuticos, diferindo apenas nas concentrações consideradas, estes serão interpretados e comparados em paralelo. Os protocolos em questão integram o Docetaxel nas concentrações 63 mg/m<sup>2</sup> e 88 mg/m<sup>2</sup> e a Gemcitabina nas concentrações 950 mg/m<sup>2</sup> e 1 750 mg/m<sup>2</sup>, aos quais foi associado o GTE po em estudo. Os resultados obtidos encontram-se devidamente tratados e representados nos diagramas de extremos e quartis das **Figura 23 (a) e (b)**.

Relativamente ao Docetaxel (88 mg/m<sup>2</sup>), constata-se que, quando associado a diferentes concentrações de GTE pó, ocorre uma diminuição dos valores de MTT<sub>padronizado</sub>, comparativamente com os obtidos para a sua ação isolada. Por outro lado, os resultados relativos à combinação de Docetaxel (63 mg/m<sup>2</sup>) com as mesmas concentrações de extrato de chá verde, evidenciam um aumento da mediana dos valores de MTT<sub>padronizado</sub>. Desta forma, parece existir uma preferencial ação adjuvante do GTE po para menores concentrações de Docetaxel, considerando a significativa redução da viabilidade celular verificada neste caso.

No que diz respeito à Gemcitabina, também é possível distinguir-se uma tendência na influência da ação do GTE po. Assim, para maiores concentrações do agente quimioterapêutico em questão (**Figura 23 (b)**), a aplicação combinada do GTE po aparenta surtir um maior efeito na indução da morte das células MCF-7.

Por último, a avaliação da ação citotóxica da associação do GTE po a cada um dos dois protocolos em comparação sugere que a maior eficácia na redução da viabilidade celular está associada ao protocolo Docetaxel 2 (63 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina 2 (1 750 mg/m<sup>2</sup>) (**Figura 23 (b)**). Neste sentido, é de notar que a integração do extrato de chá verde em estudo, no protocolo referido anteriormente, apresenta um aumento, estatisticamente significativo, da sua ação citotóxica. Como tal, as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimutagénicas do GTE po aparecem coadunar-se com os mecanismos de ação descritos para o Docetaxel e a Gemcitabina (**2.5.1**).



**Figura 23** - Gráficos de extremos e quartis relativos aos resultados de MTT obtidos nos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico dos agentes terapêuticos: **(a)** Docetaxel (Doce) (88 mg/m<sup>2</sup>), Gemcitabina (Gem) (950 mg/m<sup>2</sup>) e Docetaxel (88 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina (950 mg/m<sup>2</sup>); **(b)** Docetaxel (Doce) (63 mg/m<sup>2</sup>), Gemcitabina (Gem) (1 750 mg/m<sup>2</sup>) e Docetaxel (63 mg/m<sup>2</sup>) + Gemcitabina (1 750 mg/m<sup>2</sup>); Ambos foram avaliados de forma isolada e em associação às concentrações de GTE po *MyProtein*<sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

⇒ **Protocolo:** 5-FU (600 mg/m<sup>2</sup>) + Metotrexato (40 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>)

O presente protocolo combina a farmacodinâmica do 5-FU, Metotrexato e Ciclofosfamida, tendo sido testado *in vitro*, seguindo os mesmos contornos definidos para os protocolos previamente testados. Os dados recolhidos por espectrofotometria encontram-se tratados e representados na **Figura 24**.

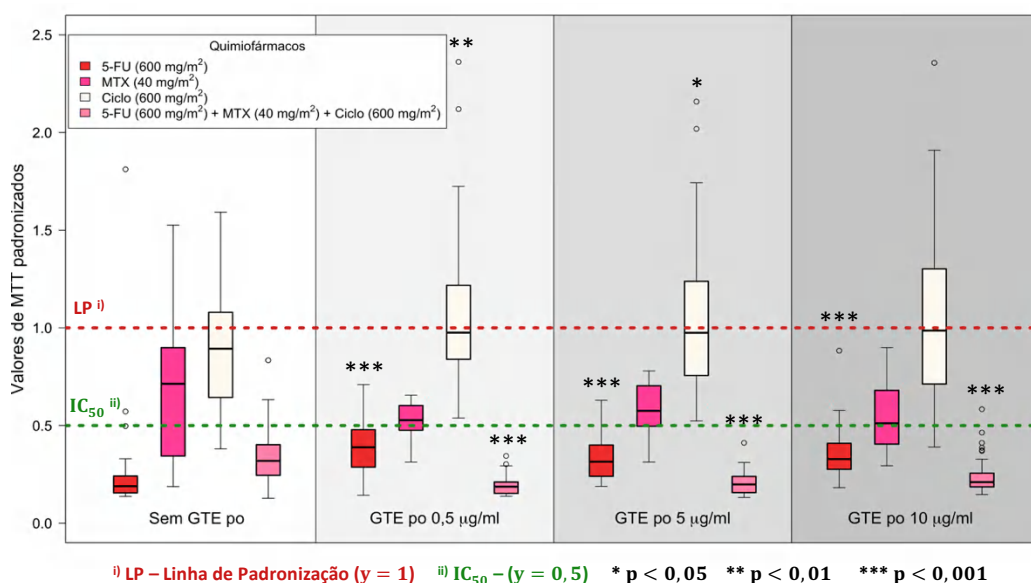
Considerando que a integração da Ciclofosfamida está presente, na mesma concentração, em vários protocolos selecionados, os dados obtidos relativos à sua ação citotóxica isolada mantêm-se, pelo que se assume a mesma análise efetuada para os protocolos supraexplorados.

Relativamente ao 5-Fluorouracilo é possível a identificação de uma perda de eficácia citotóxica, estatisticamente significativa, quando combinado com GTE po em estudo, para qualquer uma das três concentrações testadas. Contudo, os dados obtidos demonstram que, para a combinação em questão, a mediana dos valores de MTT<sub>padronizado</sub> (diretamente proporcionais à viabilidade celular) se mantém em

todas as situações abaixo da linha relativa ao parâmetro  $IC_{50}$ , revelando que, mesmo assim, é capaz de induzir a morte a mais de 50% das células MCF-7.

Por outro lado, a associação do extrato de chá verde ao Metotrexato revela um efeito adjuvante, considerando que há uma diminuição da mediana dos valores correspondentes à viabilidade celular obtidos, comparativamente à referente à ação isolada deste antimetabolito.

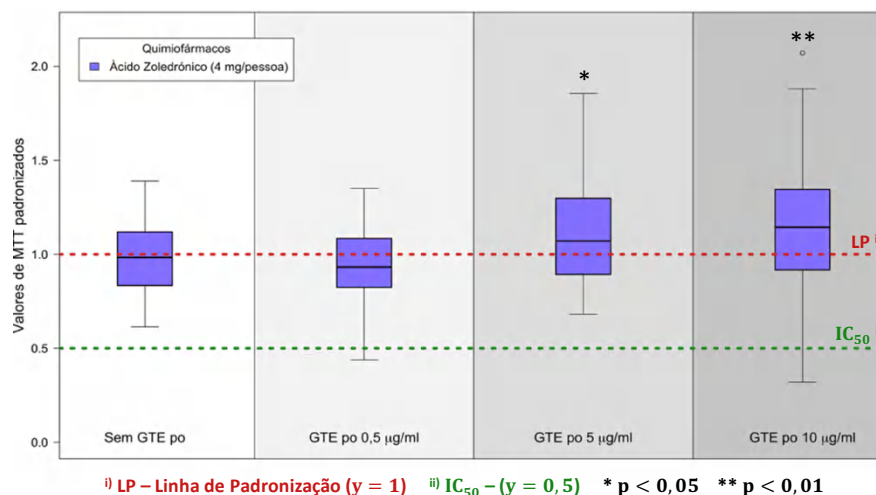
O efeito adjuvante do GTE po torna-se ainda mais evidente quando o composto natural em estudo é associado à combinação farmacológica protocolada (5-FU + Metotrexato + Ciclofosfamida). Desta forma, os resultados obtidos revelam, de forma muito significativa para todas as concentrações de GTE po aplicadas ( $p < 0,001$ ), uma diminuição da mediana dos valores de  $MTT_{padronizado}$ , relativamente à mediana obtida para a ação isolada da combinação dos 3 fármacos protocolados. Como tal, constata-se, de forma estatisticamente significativa, que o GTE po potencia os mecanismos de ação do presente protocolo clínico. Este comportamento poderá ser justificado pelo facto de as propriedades características do GTE po o tornarem capaz de inibir fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral, nomeadamente proteínas, indo ao encontro da ação dos antimetabolitos em questão, os quais promovem a inibição de enzimas necessárias à proliferação das células cancerígenas.



**Figura 24** - Diagrama de extremos e quartis ilustrativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) obtidos nos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação da toxicidade dos agentes terapêuticos 5-Fluorouracilo (5-FU) (600 mg/m<sup>2</sup>), Metotrexato (MTX) (40 mg/m<sup>2</sup>), Ciclofosfamida (Ciclo) (600 mg/m<sup>2</sup>) e 5-Fluorouracilo (600 mg/m<sup>2</sup>) + Metotrexato (40 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação às concentrações de GTE po (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

⇒ **Protocolo:** Ácido Zoledrónico (4 mg/pessoa)

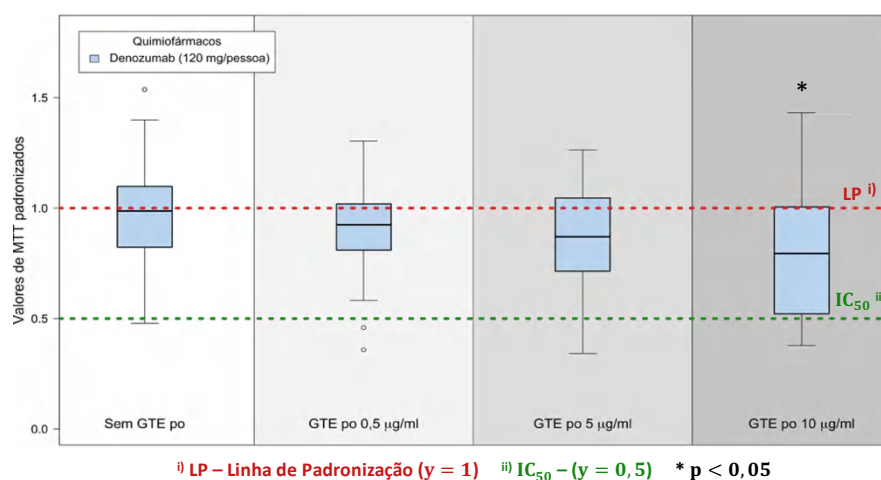
A **Figura 25** sintetiza os resultados relativos aos ensaios de viabilidade celular efetuados, considerando a associação do Ácido Zoledrónico ao extrato de chá verde nas distintas concentrações em estudo. Pela sua análise é possível identificar que a mediana dos valores de  $MTT_{padronizado}$  permanece muito próxima ou acima da linha de padronização, quer quando o bifosfonato é aplicado isoladamente, quer quando está em combinação com o GTE po. Desta forma, reconhece-se a inexistência de efeito citotóxico do protocolo em estudo, nas condições definidas para os ensaios *in vitro* realizados, assim como a ausência de uma ação adjuvante estatisticamente significativa por parte deste extrato de chá verde. Estes resultados são corroborados pelo mecanismo de ação do Ácido Zoledrónico, o qual promove a redução da função osteoclástica, associando-se diretamente à hidroxiapatite. Neste sentido, tendo em consideração que as células selecionadas para a execução dos estudos *in vitro* correspondem às MCF-7, não existe substrato para a ligação e consecutiva ação do Ácido Zoledrónico, o que justifica a sua incapacidade em promover a morte das células tumorais nos ensaios realizados.



**Figura 25** - Gráfico de extremos e quartis representativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) obtidos nos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a avaliação do efeito citotóxico do agente terapêutico Ácido Zoledrónico (4 mg/pessoa). Este foi avaliado de forma isolada e em associação às concentrações de GTE po *MyProtein*<sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

⇒ **Protocolo:** Denozumab (120 mg/pessoa)

No que concerne ao Denozumab, os resultados decorrentes da sua aplicação, de forma isolada e conjunta com o GTE po nos ensaios *in vitro* com a linhagem MCF-7, encontram-se sintetizados no gráfico de extremos e quartis da **Figura 26**.



**Figura 26** - Diagrama de extremos e quartis relativo aos resultados de MTT obtidos nos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação do efeito citotóxico do agente terapêutico Denozumab (120 mg/pessoa). Este foi avaliado de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po *MyProtein*<sup>®</sup> (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

A sua interpretação permite observar uma redução progressiva dos valores de  $MTT_{padronizado}$  sempre que este agente terapêutico é associado a concentrações sucessivamente mais elevadas do extrato de chá verde em estudo. Quer isto dizer que se verifica uma ação adjuvante do GTE po, a qual se apresenta como estatisticamente significativa para a concentração 10 µg/ml ( $p = 0,0118$ ). Desta forma, é possível constatar que ocorre uma redução da viabilidade celular das células MCF-7, quando o presente protocolo é combinado com a estimulação diária de GTE po. Este resultado pode ser justificado pelo mais recente mecanismo de ação do Denozumab reportado na literatura, o qual expande a sua ação para além do tecido ósseo. Assim, este anticorpo monoclonal é responsável pela sua ligação ao RANKL, impedindo, por sua vez, a ligação do

RANKL ao seu recetor (RANK), o que é fundamental para a inibição da progressão tumoral, já que os níveis de RANKL estão aumentados no estroma em torno do cancro da mama (2.5.1). Neste sentido, considerando as propriedades descritas em 2.5.2 associadas ao GTE po, percebe-se que este agente natural, ao apresentar a capacidade de inibir fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral, poderá ter uma significativa influência na redução da expressão proteica de RANKL, potenciando a ação do Denozumab.

⇒ **Protocolo:** Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) + Epirrubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (1 200 mg/m<sup>2</sup>) vs Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) + Doxorubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (1 200 mg/m<sup>2</sup>)

Os últimos dois protocolos clínicos realizados nos ensaios *in vitro* incluem Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) e Ciclofosfamida (1 200 mg/m<sup>2</sup>), diferindo apenas no fármaco pertencente à classe das antraciclinas - Epirrubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) ou Doxorubicina (75 mg/m<sup>2</sup>). Assim, será efetuada uma análise paralela de ambos (Figuras 27 (a) e (b)), de forma a inferir acerca da possível ação adjuvante da respetiva associação ao GTE po.

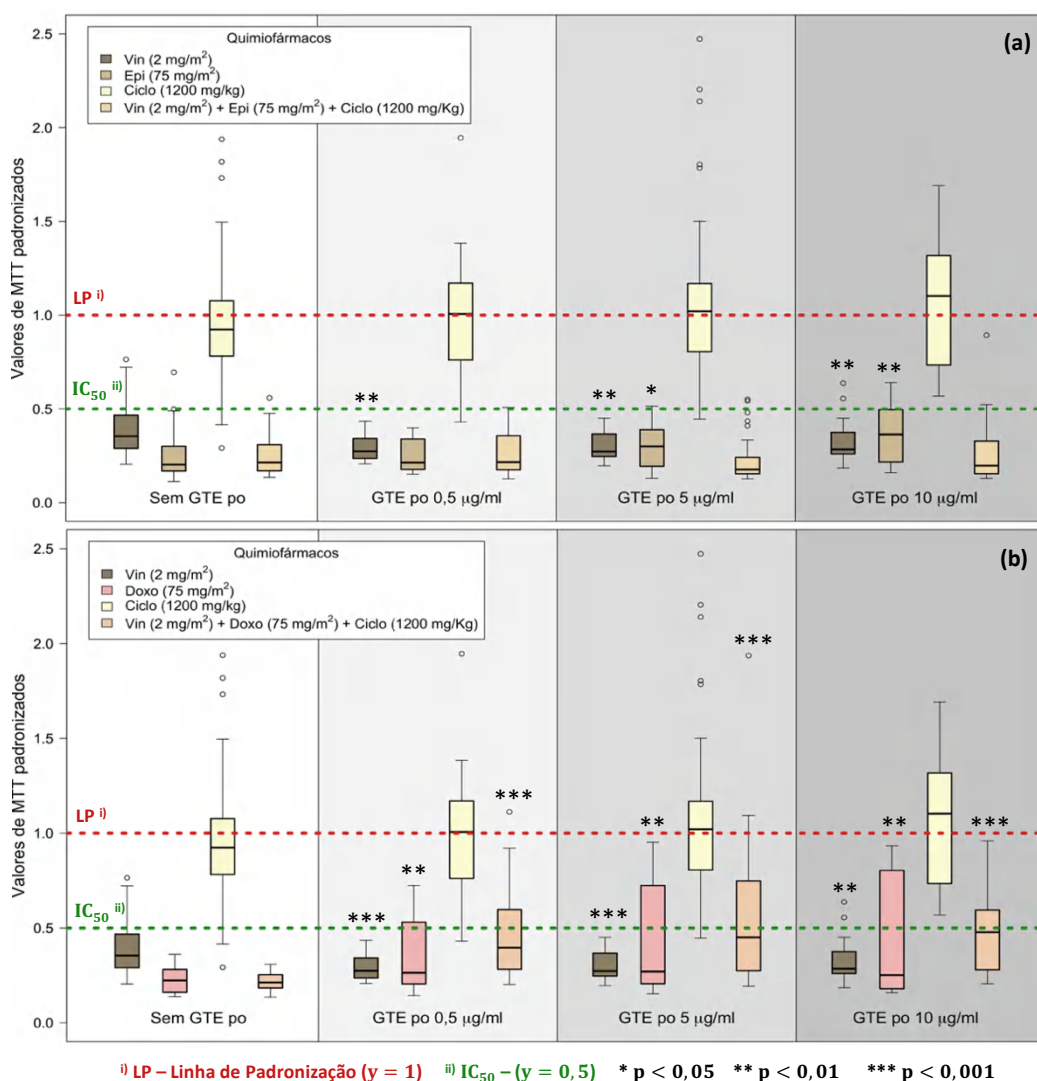
Em primeiro lugar, foi avaliada a ação citotóxica da Vincristina, de forma isolada e combinada com as várias concentrações do extrato de chá verde em estudo. Após a análise dos valores de espectrofotometria padronizados obtidos (Figura 27), é possível constatar que a conjugação da aplicação de Vincristina e a estimulação diária com GTE po se traduz numa redução, estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), da viabilidade celular destas células neoplásicas, comparativamente à ação isolada do fármaco em questão. Esta ação adjuvante do GTE po relativamente ao mecanismo de ação do Vincristina, pode estar associada à inibição do ciclo celular em fases complementares, por parte de ambos os agentes em observação. Adicionalmente, e tal como exposto no protocolo supraexplorado, o GTE po apresenta a capacidade de inibir fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral, nomeadamente na expressão proteica, o que, ao coadunar-se com a farmacodinâmica do Vincristina (2.5.1), pode potenciar a sua ação citotóxica.

Quanto aos compostos diastereoisómeros Doxorubicina e Epirrubicina, estes alternam a sua integração no protocolo selecionado, sendo que, molecularmente, diferem apenas na posição de um dos grupos OH, tornando-se interessante analisar o seu efeito citotóxico isolado e em associação com o GTE pó. O gráfico de extremos e quartis da Figura 27 (a) ilustra um aumento progressivo da mediana dos valores de  $MTT_{\text{padronizado}}$  obtidos quando a Epirrubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) é combinada com as concentrações sucessivamente mais elevadas de GTE pó. Desta forma, pode inferir-se que a aplicação simultânea do GTE po e da Epirrubicina conduz à diminuição do efeito citotóxico isolado deste agente quimioterapêutico. Contudo, é importante destacar que, apesar da redução do poder citotóxico em questão, a combinação Epirrubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) + GTE po apresenta, para todas as concentrações do composto natural associadas, uma mediana inferior à linha do parâmetro  $IC_{50}$ , revelando, mesmo assim, ser capaz de induzir a morte a mais 50% das células MCF-7.

No que concerne à Doxorubicina, também se verifica um decréscimo da sua capacidade em induzir a morte das células tumorais, quando este agente quimioterapêutico é associado à estimulação com as distintas concentrações de GTE po. No entanto, esta perda de potencial citotóxico, comparativamente com a sua ação isolada, é ainda mais acentuada do que a verificada para a Epirrubicina, já que, nesta situação, alguns dos valores de  $MTT_{\text{padronizado}}$  se encontram acima do  $IC_{50}$ . Como tal, este comportamento pode estar relacionado com o facto de um dos três principais mecanismos de ação das antraciclinas passar pela formação e acumulação de radicais livres, a qual é condicionada pelas propriedades antioxidantes do GTE po.

Novamente, atentando que a Ciclofosfamida está contemplada em vários dos protocolos selecionados, apesar de numa concentração inferior, os dados obtidos para a sua ação citotóxica mantêm-se, quer na sua forma isolada, quer em associação ao GTE po. Assim, é possível assumir a mesma análise efetuada para os protocolos acima explorados, bem como constatar que nem para concentrações superiores deste fármaco se verifica uma ação adjuvante do GTE po, o que corrobora a justificação anteriormente proposta.

Relativamente à combinação farmacologia protocolada, os dados revelam apenas uma ação adjuvante do GTE po, para todas as concentrações testadas, quando a antraciclina que integra o protocolo clínico corresponde à Epirrubicina (Figura 27 (a)). Esta tendência pode ser justificada pela influência da ação isolada dos agentes quimioterapêuticos que integram o protocolo clínico, já que segue o comportamento supramencionado para cada um deles, na sua forma isolada e combinada com o GTE po.



**Figura 27** - Gráfico de extremos e quartis ilustrativo dos resultados do teste de viabilidade celular (MTT) dos ensaios *in vitro* (com a duração de 6 dias, para a linha celular MCF-7) para a apreciação da toxicidade dos agentes terapêuticos: (a) Vincristina (Vin) (2 mg/m<sup>2</sup>), Epirrubicina (Epi) (75 mg/m<sup>2</sup>), Ciclofosfamida (Ciclo) (1 200 mg/ m<sup>2</sup>) e Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) + Epirrubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (1 200 mg/ m<sup>2</sup>); (b) Vincristina (Vin) (2 mg/m<sup>2</sup>), Doxorubicina (Doxo) (75 mg/m<sup>2</sup>), Ciclofosfamida (Ciclo) (1 200 mg/ m<sup>2</sup>) e Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) + Doxorubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) + Ciclofosfamida (1 200 mg/ m<sup>2</sup>). Estes foram avaliados de forma isolada e em associação com as concentrações de GTE po MyProtein® (0,5 - 5 - 10 µg/ml).

## 4.2. Ensaios *in vivo*

A inoculação da suspensão de células MCF-7, tal como descrito em 3.4.1, permitiu o desenvolvimento de dois modelos animais de indução tumoral – modelo não-ortotópico de tumor primário da mama e modelo de tumor metastático – definindo o início da execução dos ensaios *in vivo* incluídos na presente dissertação. Os modelos em questão foram constantemente monitorizados, quer através de exames físicos (para registo da massa e avaliação de sinais externos de desenvolvimento tumoral), quer a partir de estudos imagiológicos, segundo o procedimento exposto em 3.4.2.

Sendo a monitorização supramencionada foi indicativa de desenvolvimento tumoral, se iniciou-se o protocolo terapêutico, selecionado com base nos resultados mais promissores obtidos nos ensaios *in vitro*, apresentados e discutidos na secção anterior.

Considerando as limitações impostas pelos imprevistos relacionados com a reprodução da colónia de murganhos *nude* do Vivarium da FMUC-iCBR, apenas foi possível testar *in vivo* duas das combinações terapêuticas estudadas ao longo dos ensaios *in vitro* realizados: **Animal 1 (Modelo de indução de metástases ósseas)** - Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) + GTE po (0,55 mg/g); **Animal 2 (Modelo não-ortotópico de tumor primário**

**da mama)** - Docetaxel (88 mg/m<sup>2</sup>) + GTE po (0,55 mg/g). Contudo, salvaguarda-se que a projeção inicial passava pela definição de vários grupos de estudo, sendo cada um deles constituído por animais submetidos às terapêuticas clínicas (com os melhores resultados obtidos na avaliação realizada *in vitro*), conforme protocolado e com a respetiva associação ao GTE po.

Desta forma, foram adquiridas imagens PET de cada um dos animais que constituem o presente estudo longitudinal, usando o sistema *easyPET.3D*. A sua calendarização se regeu-se pela disponibilidade dos radiofármacos, [<sup>18</sup>F]-FDG e [<sup>18</sup>F]-NaF, fornecidos graciosamente pelo CHUC.

Após a reconstrução, através de um *software* desenvolvido pela equipa, as imagens foram processadas com recurso ao *software free* AMIDE, cujas ferramentas e funcionalidades viabilizaram a aplicação de filtros e o ajuste da escala de cores (*hot scale* e *black/white linear*), no sentido de melhorar a sua qualidade. Adicionalmente, o *software* utilizado permitiu a definição de regiões de interesse (ROI – *Region of Interest*) nas imagens analisadas, as quais são fundamentais para que o processo de quantificação apresente resultados robustos, reprodutíveis e confiáveis. Como tal, atendendo ao objetivo da presente dissertação, as referidas ROIs foram desenhadas de forma que a sua representação tridimensional integrasse o volume correspondente à massa tumoral desenvolvida (VOI – *Volume of Interest*).

A análise quantitativa tecida sustenta-se no cálculo do SUV (*Standardized Uptake Value*), um parâmetro adimensional amplamente utilizado em contexto clínico e pré-clínico, que viabiliza a quantificação do radiofármaco nos tecidos de interesse. Os valores de SUV, que funcionam como uma ferramenta complementar à interpretação visual das imagens adquiridas, podem ser determinados através da razão descrita pela **Equação 2** [86]. Note-se que, **A'** traduz a dose total de atividade injetada (Bq), **w** representa a massa do animal (g) e **C(t)** é referente à concentração de radioatividade presente no tecido de interesse num determinado momento (Bq/ml), sendo obtida através dos parâmetros associados à VOI definida:

$$SUV_{\text{Médio}} = \frac{C(t)}{\frac{A'}{w}} \quad \text{Equação 2}$$

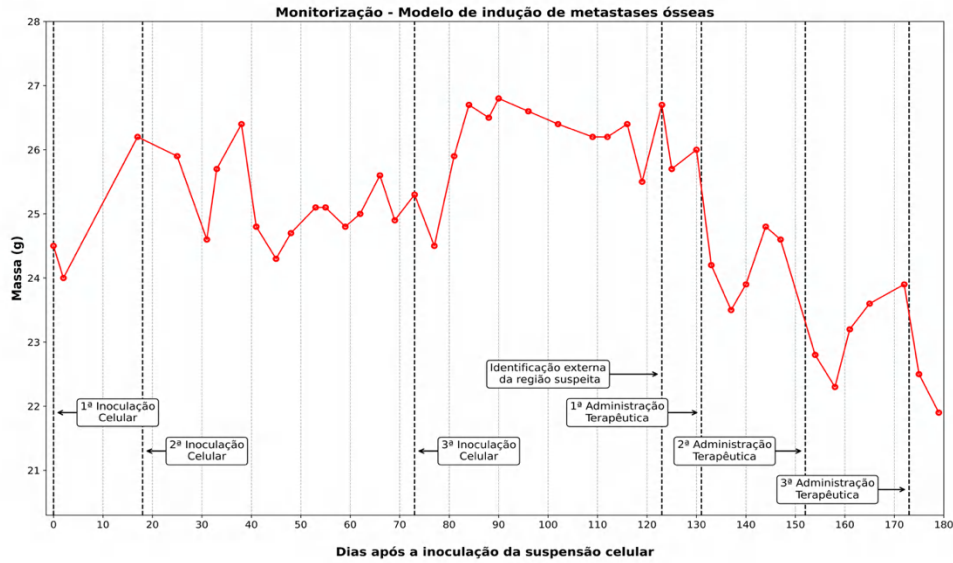
A análise qualitativa da evolução de cada um dos modelos animais foi efetuada com base nos dados da monitorização física e imagiológica, de acordo com o procedimento exposto em 3.4.2. A análise quantitativa, baseada na variação do SUV<sub>Médio</sub> ao longo do estudo, na ROI, permite a apreciação da eficácia da indução tumoral efetuada, a avaliação do impacto da terapêutica administrada, bem como a discussão quanto à importância/eficiência do sistema *easyPET.3D* na deteção precoce e monitorização do desenvolvimento e progressão tumoral, comprovada pela análise histológica.

#### ⇒ **Animal 1 (Modelo de indução de metástases ósseas)**

O Animal 1 foi inicialmente submetido ao procedimento de escarificação óssea e consecutiva inoculação da suspensão de células MCF-7, não se tendo identificado, pela monitorização física, qualquer evidência de desenvolvimento tumoral no fim das 10 semanas após a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> inoculação celular. Assim, este procedimento foi repetido uma 3<sup>a</sup> vez (**Figura 28**). Tal pode estar relacionado com a não total inibição do sistema imunitário do animal, o que é sustentado pela identificação externa do crescimento de algum pelo.

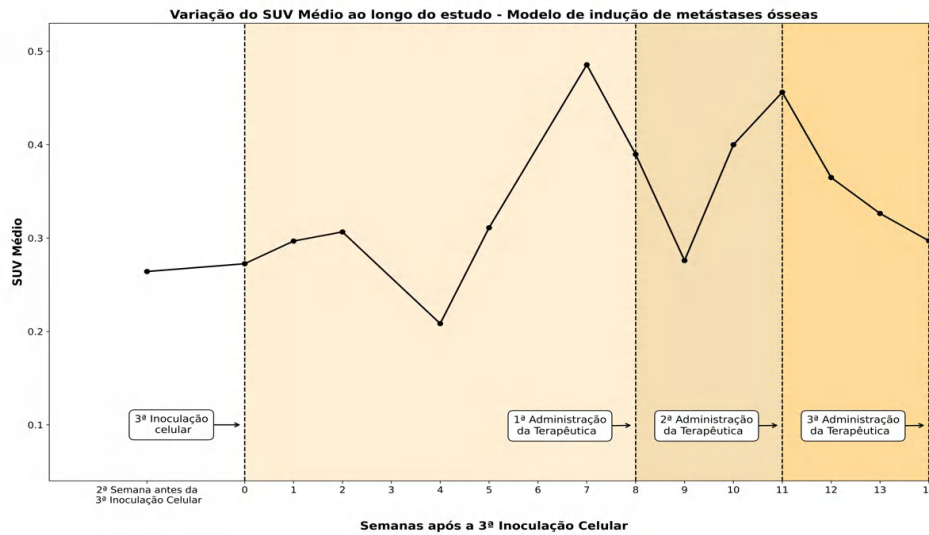
Após a 3<sup>a</sup> inoculação celular, verifica-se (**Figura 29**) uma ligeira variação positiva do SUV<sub>Médio</sub>, comparativamente com o valor obtido na imagem adquirida 2 semanas antes desta intervenção. Contudo, à 4<sup>a</sup> semana de registo imagiológico, distingue-se a diminuição do valor do SUV<sub>Médio</sub>, o que pode ser justificado pela absorção da suspensão celular inoculada e pela redução da inflamação local causada pela escarificação da calote craniana. Posteriormente, houve um aumento acentuado dos valores de SUV<sub>Médio</sub>, assim como um aumento da captação de radiofármaco (sensivelmente na zona escarificação óssea) (**Figura 30**). Esta tendência pode ser explicada pela presença de células metabolicamente mais ativas, o que é compatível com o desenvolvimento tumoral na região escarificada. O valor máximo de SUV<sub>Médio</sub> foi registado na 7<sup>a</sup> semana após a inoculação celular, mas a progressão tumoral fio só traduzida, ao longo da 8<sup>a</sup> semana, pela identificação de uma ténue elevação não-mensurável na calote craniana, indicando o papel determinante do sistema *easyPET.3D*.





**Figura 28** - Registo da monitorização física do Animal 1, após a 1ª inoculação celular.

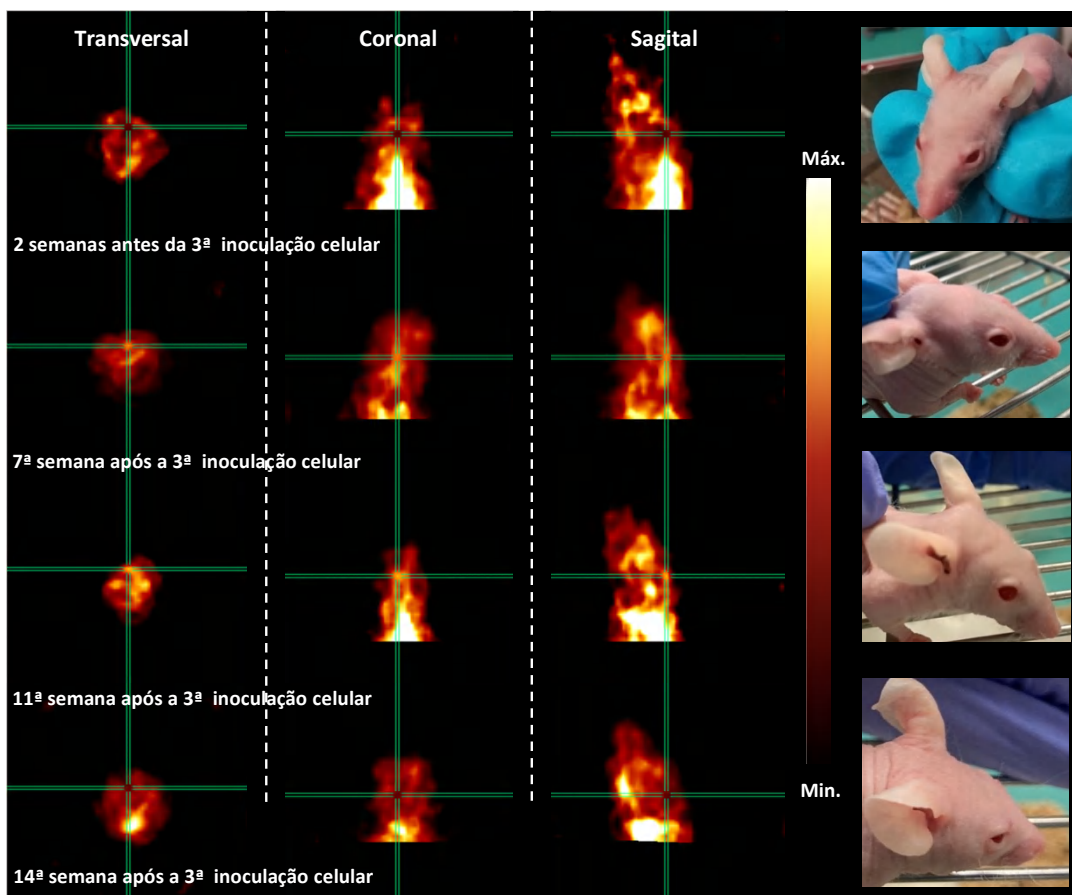
A 8ª semana, após a inoculação celular, marca o início da administração da terapêutica selecionada ao Animal 1: Vincristina ( $2 \text{ mg/m}^2$ ), a cada 3 semanas, e GTE po ( $0,55 \text{ mg/g}$ ), com uma frequência diária, (metodologia descrita em 3.4.1.3). Cada um dos 3 ciclos de Vincristina efetuados traduziu-se numa acentuada redução da massa do animal nos dias subsequentes, verificando-se, contudo, uma considerável recuperação, dias após o início de cada um deles (Figura 28). Este efeito pode estar relacionado com a administração diária do extrato de chá verde em estudo, cujas propriedades intrínsecas parecem influenciar neste mesmo sentido. No que concerne ao impacto da terapêutica no  $SUV_{\text{Médio}}$ , distingue-se uma redução do seu valor na imagem adquirida na semana seguinte à 1ª administração de Vincristina. No entanto, este parâmetro volta a apresentar uma tendência de crescimento, atingindo um novo valor máximo na 11ª semana, ainda que inferior ao 1º valor máximo de  $SUV_{\text{Médio}}$  registado. Esta tendência parece ser idêntica ao que se verifica em contexto clínico: um ciclo de tratamento não é suficiente para a cura do doente, sendo prevista a realização de vários ciclos consecutivos da terapêutica ou, em alguns casos, alternada com fármacos distintos e de ação complementar [71].



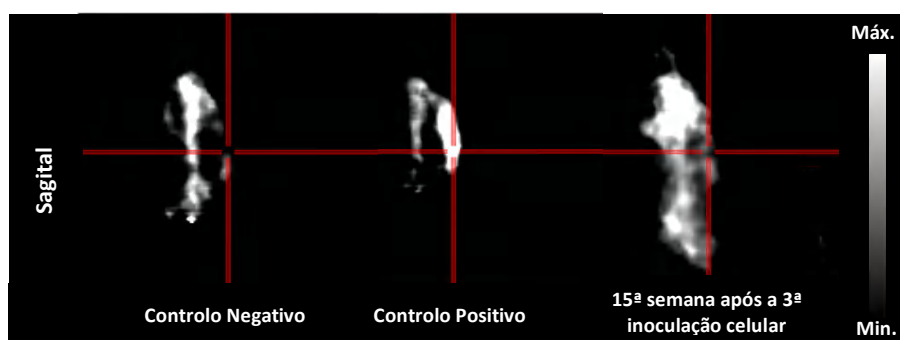
**Figura 29** – Variação dos valores de  $SUV_{\text{Médio}}$  referentes às regiões de interesse definidas, ao longo do estudo, tendo sido obtidos com recurso à metodologia supraexplorada.

A 2ª administração de Vincristina coincide com a 11ª semana de estudo imagiológico após a inoculação celular: todos os valores de  $SUV_{\text{Médio}}$  calculados posteriormente exibem uma contínua diminuição, até se atingir um valor próximo do registado nas primeiras após a inoculação. Este comportamento, associado à redução da captação de radiofármaco na região de interesse (Figura 30), é indicativo de uma evidente

regressão tumoral. A última aquisição de imagem do Animal 1 foi realizada com recurso ao  $[^{18}\text{F}]\text{-NaF}$ , sendo possível verificar, através do estabelecimento de uma comparação qualitativa, que a captação de radiofármaco na região aproximada da escarificação óssea se contra semelhante à identificada no controlo negativo (Figura 31). Como tal, infere-se que a atividade osteoclástica/osteoblástica não será tão predominante como a do controlo positivo, corroborando a discussão anteriormente formulada.



**Figura 30** – Composição de imagens relativas à evolução tumoral do Animal 1, obtidas com o sistema *easyPET.3D* após a administração de  $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ . Esta integra os cortes transversal (à esquerda), coronal (ao centro) e sagital (à direita), com 0,6 mm de espessura. O cursor verde identifica a mesma posição, em cada uma das imagens (aproximadamente o local da escarificação óssea e da inoculação celular). Ao lado é incluído o registo fotográfico da monitorização física do animal.

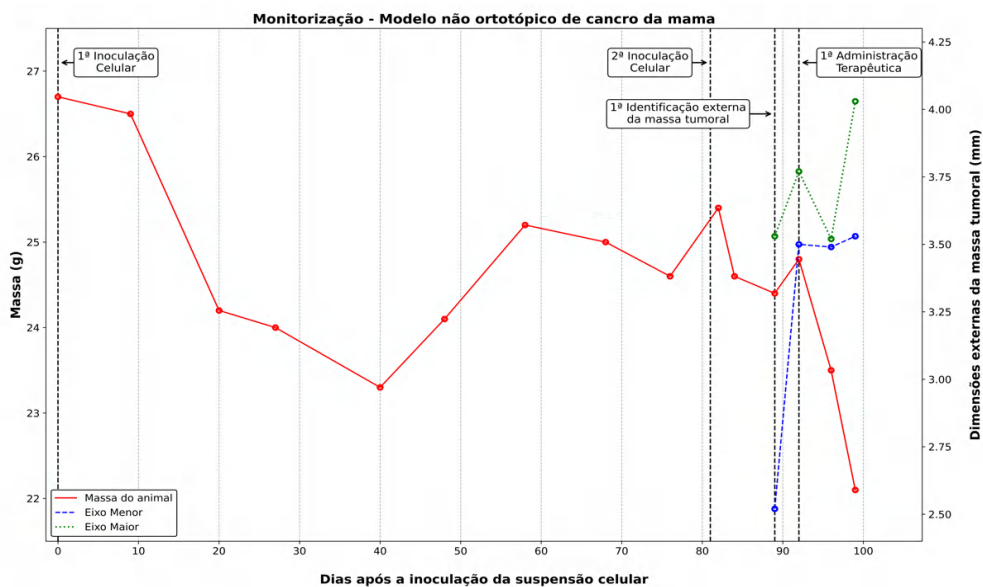


**Figura 31** – Composição de imagens de um corte sagital com 1 mm de espessura, obtidas com recurso ao sistema *easyPET.3D* após a administração de  $[^{18}\text{F}]\text{-NaF}$ . O cursor vermelho identifica, aproximadamente, o local da escarificação óssea no controlo negativo (sem desenvolvimento metastático), positivo (com metástases ósseas) e na última imagem adquirida do Animal 1.

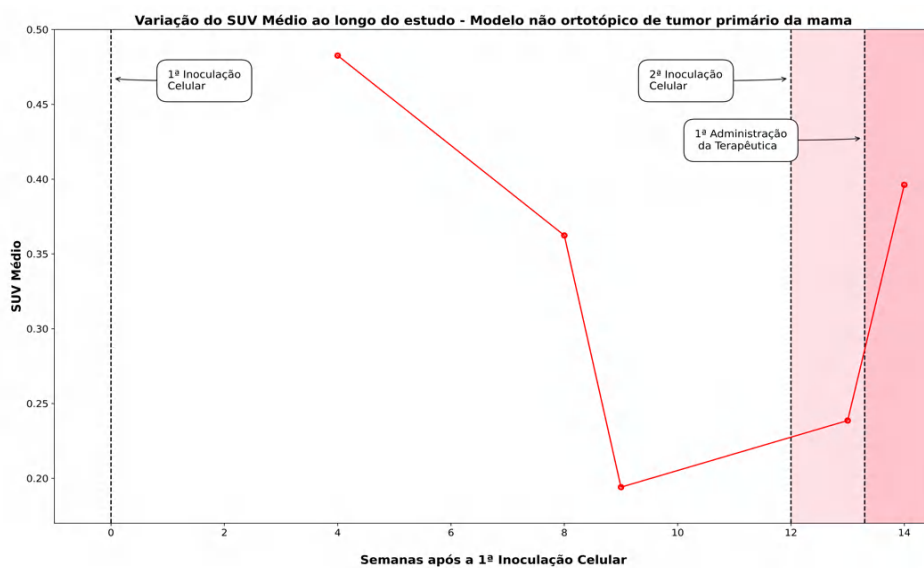
⇒ **Animal 2 (Modelo não-ortotópico de tumor primário da mama)**

O Animal 2 foi submetido à inoculação da suspensão de células MCF-7, tal como descrito em 3.4.1.1. Quanto à evolução da indução tumoral realizada, esta não foi externamente evidente até à 12ª semana após o referido procedimento, tal como ilustra a **Figura 32**. Contudo, o  $SUV_{Médio}$  calculado para a 1ª imagem adquirida do animal (4ª semana após a 1ª inoculação celular) corresponde ao valor máximo obtido ao longo de todo o estudo (**Figura 33**). Por sua vez, as aquisições de imagem posteriores revelam uma diminuição do parâmetro em questão (8ª e 9ª semana após a 1ª inoculação celular). A leitura efetuada permite, em primeiro lugar, perceber o ímpar contributo da tecnologia *easyPET*, já que foi capaz de identificar uma alteração da atividade metabólica, resultante do desenvolvimento tumoral induzido, muito antes de se registarem quaisquer evidências externas. Em segundo lugar, torna-se fundamental justificar a redução do  $SUV_{Médio}$  registada, que poderá estar associada a uma resposta imunitária do animal, considerando os sinais que apontam para a possibilidade de esta não estar totalmente inibida, como a presença de algum pelo.

Tendo por base a evolução descrita, procedeu-se à inoculação de uma 2ª suspensão celular, o que levou a um aumento da captação de radiofármaco na região de interesse, tal como ilustra a **Figura 34**.

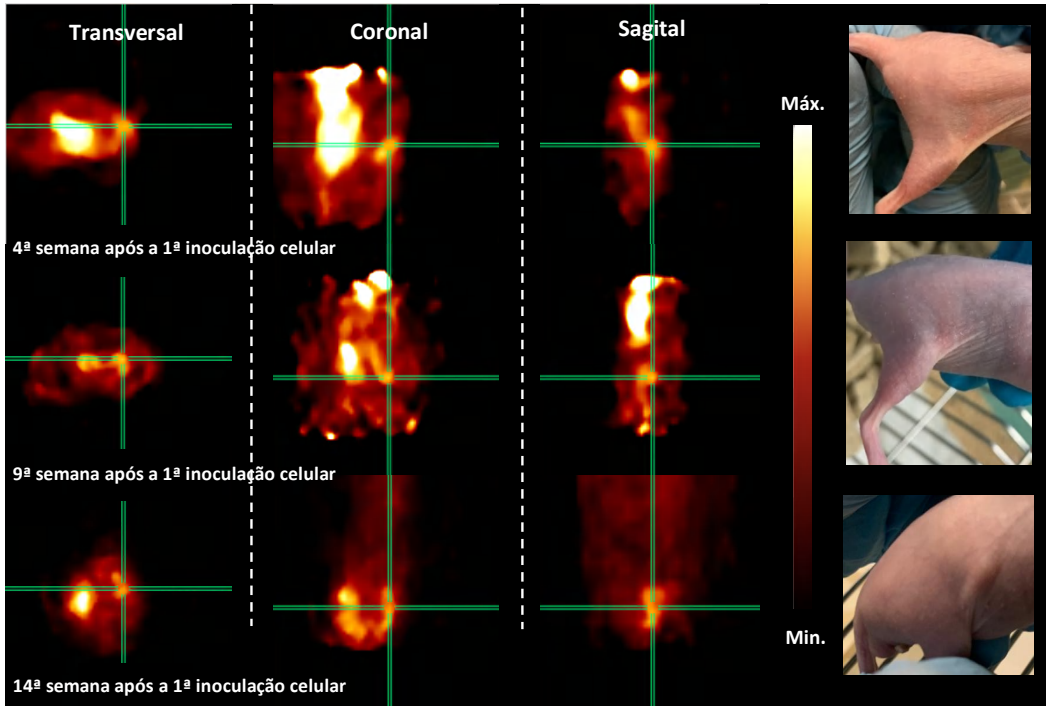


**Figura 32** - Registo da monitorização física do Animal 2, após a 1ª inoculação celular.



**Figura 33** - Valores de  $SUV_{Médio}$  obtidos, para cada uma das imagens do Animal 2 adquiridas, a partir da região de interesse definida.

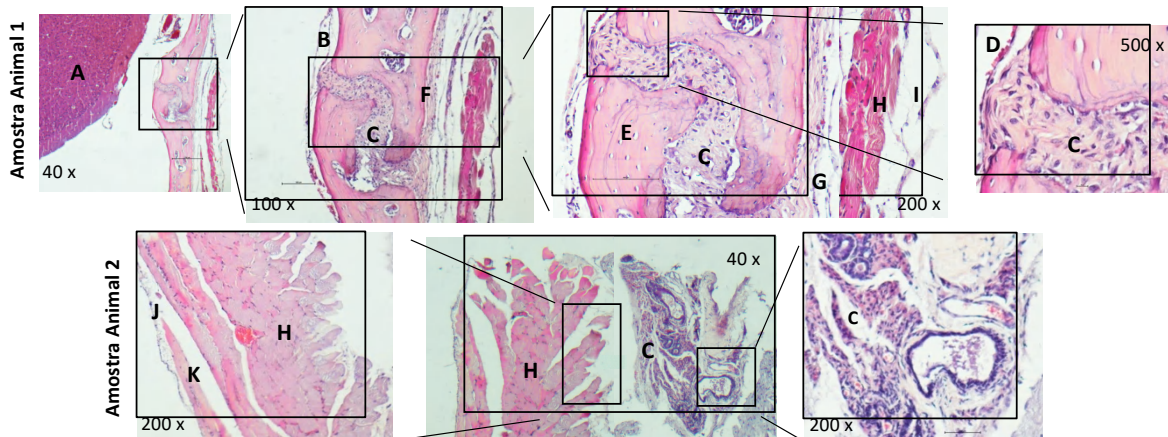
O reconhecimento externo de uma massa compatível com o desenvolvimento tumoral (**Figura 32**) e o aumento do valor do  $SUV_{Médio}$  (na imagem adquirida na semana da referida identificação) sustentou o início da terapêutica selecionada: Docetaxel ( $88 \text{ mg/m}^2$ ) - 3 em 3 semanas - e GTE po ( $0,55 \text{ mg/g}$ ) diariamente. No entanto, e em resposta à terapêutica, o Animal 2 exibiu uma acentuada redução de massa, a qual, aliada ao desenvolvimento de um prolapso retal, culminou no seu óbito. Assim, encontra-se limitada a avaliação da eficácia da terapêutica selecionada, sendo que o modelo permite, contudo, reconhecer o papel determinante do sistema *easyPET.3D* na monitorização do animal em estudo.



**Figura 34** – Imagens PET relativas à evolução tumoral do Animal 2 obtidas com o sistema *easyPET.3D* após a administração de  $[^{18}F]$ -FDG. Estas contemplam os cortes transversal (à esquerda), coronal (ao centro) e sagital (à direita), com 0,6 mm de espessura. O cursor verde identifica a mesma posição (o local aproximado da inoculação celular), em cada uma das imagens. Ao lado é incluído o registo fotográfico relativo à monitorização física do animal.

### ⇒ Avaliação histológica

As amostras recolhidas na necropsia dos Animais 1 e 2, processadas para estudos histológicos de rotina (H&E) (**3.5**), corroboram a análise e conclusões formuladas, tal como ilustram as estruturas da **Figura 35**.



**Figura 35** – Observação das preparações histológicas coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (H&E) ao microscópio ótico, onde se identificam: **A** - Cérebro; **B** - Tábua óssea interna; **C** - Tumor; **D** - Cápsula fibrosa; **E** - Osteoide; **F** - Tábua óssea externa; **G** - Aponevrose; **H** - Músculo; **I** - Pele; **J** - Epiderme; **K** - Derme (40x; 100x; 200x; 500x).

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

A presente dissertação, que de agora em diante se conclui, teve como um dos principais objetivos a avaliação da eficácia do *Green Tea Extract Powder* (GTE po), como potencial adjuvante natural de distintos agentes terapêuticos sistêmicos e direcionados. Foram realizados vários ensaios *in vitro*, com a linha celular MCF-7. Nos ensaios em questão, foi avaliada a ação citotóxica de vários agentes terapêuticos utilizados, em contexto clínico, para o tratamento do tumor maligno da mama e conseqüente desenvolvimento metastático, na sua forma isolada e combinada com o GTE po. Os resultados obtidos para a apreciação da ação isolada de GTE po demonstraram que o composto natural em estudo exibe ação terapêutica, para as várias concentrações testadas, com uma probabilidade de 66%. A sua associação a agentes terapêuticos sistêmicos e direcionados utilizados no tratamento do cancro da mama apresentam resultados promissores nos protocolos: Pacli + Gem, Doce + Gem e 5-FU + MTX + Ciclo. Assim, a inclusão do agente natural em estudo conduziu a uma significativa redução da viabilidade celular. Torna-se relevante destacar o aumento do poder citotóxico de alguns fármacos *per se* e não nos protocolos clínicos, tais como: Gem, MTX e Doce. Quanto aos ensaios *in vitro* sustentados na integração de GTE pó em protocolos terapêuticos direcionados à doença metastática, salienta-se o comportamento do Denozumab e Vin + Epi + Ciclo. Estes apresentaram uma redução progressiva da viabilidade celular sempre que foram associados a concentrações sucessivamente mais elevadas de GTE po. Concomitantemente, é de realçar que a ação da Vincristina (2 mg/m<sup>2</sup>) é significativamente potenciada pela sua combinação a cada uma das 3 concentrações de GTE po. Por outro lado, reconhece-se a ineficácia da associação do GTE pó a alguns dos protocolos selecionados, sendo que as possíveis razões para este comportamento foram devidamente exploradas ao longo do capítulo prévio.

A transposição da avaliação da eficácia da associação de GTE po aos protocolos clínicos com os resultados *in vitro* mais promissores para os modelos animais selecionados, constituiu o segundo objetivo da presente dissertação. Para tal, foi inoculada uma suspensão de células MCF-7 em 2 animais balb/c *nude*. A sua monitorização, para além de sustentada em exames físicos frequentes, foi possível com recurso a um sistema inovador de aquisição imagens PET – o *easyPET.3D*. Desta forma, foi exequível o cumprimento do terceiro objetivo da atual investigação, o qual passou por comprovar a relevância do sistema em questão na deteção de estádios precoces do desenvolvimento tumoral, bem como na monitorização da resposta à terapêutica. Neste âmbito, a progressão tumoral do Animal 1 foi evidente nas imagens PET adquiridas, com a administração de [<sup>18</sup>F]-FDG, na 7ª semana após a 3ª inoculação celular, precedendo a identificação da ténue elevação não mensurável na região da escarificação óssea. No que concerne ao impacto da terapêutica, o modelo em questão exibiu um comportamento interessante ao mimetizar o que acontece em contexto clínico após a 1ª administração de Vin. Os valores de SUV<sub>Médio</sub>, calculados para as aquisições de imagem posteriores ao 2º ciclo de tratamento, exibiram uma contínua diminuição, até se aproximarem do registado nas semanas após indução tumoral. A tendência decrescente deste parâmetro, aliada aos resultados histológicos obtidos e à avaliação qualitativa das imagens adquiridas com recurso ao [<sup>18</sup>F]-NaF, permitem concluir a presença de uma regressão tumoral. Salienta-se, ainda, a considerável recuperação de massa corporal do Animal 1, dias após o início de cada um dos ciclos de injeção Vincristina, o pode estar relacionado com a administração diária do GTE po em estudo, cujas propriedades intrínsecas parecem incrementar a sua qualidade de vida. No que diz respeito ao Animal 2, a indução tumoral não foi externamente evidente até à 12ª semana após o referido procedimento. Contudo, a tecnologia *easyPET* permitiu reconhecer uma redução dos valores de SUV<sub>Médio</sub> registados ao longo das primeiras imagens adquiridas, a qual pode estar associada a uma resposta imunitária do animal. Assim, apesar deste modelo não permitir inferir qualquer conclusão acerca da eficácia da terapêutica administrada – Doce + GTE po, pela influência dos efeitos secundários desenvolvidos, este permite reconhecer o enorme contributo do sistema *easyPET.3D*.

Como perspetiva de desenvolvimento futuro destaca-se o aumento da robustez estatística, através da ampliação do número de ensaios de MTT realizados e pelo estudo do efeito citotóxico isolado do GTE po numa linha celular normal de mama. Será também interessante executar ensaios de citometria de fluxo e de sulforodamina B para se comprovar as inferências tecidas aquando da interpretação dos resultados *in vitro* obtidos. Adicionalmente, dadas as características descritas para a linha celular MCF-7, reconhece-se a possibilidade de se efetuarem ensaios *in vitro* tridimensionais com agregados multicelulares esféricos. Quanto aos ensaios *in vivo*, é fulcral o aumento do número dos grupos de animais em estudo, de forma que cada um deles seja constituído por animais submetidos às terapêuticas clínicas conforme protocolado e com a respetiva associação ao GTE po. Quanto aos ensaios imagiológicos, destaca-se o interesse da associação da tomografia computadorizada ao sistema *easyPET.3D*, de forma a permitir a identificação das estruturas anatómicas de forma mais facilitada. Este conhecimento é fundamental para o incremento da precisão da definição das ROIs, a qual é condicionada pelas alterações morfológicas promovidas pela progressão tumoral. Por último, e no sentido de minimizar os efeitos secundários da anestesia intraperitoneal, será uma perspetiva futura a realização dos exames PET com anestesia gasosa, reduzindo, de forma simultânea e considerável, o tempo de recobro.

## 6. Referências bibliográficas

- [1] GLOBOCAN 2020: Novos dados globais sobre o cancro. Publicado em 2021. Acedido a 15 de setembro, 2022. <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- [2] Global Cancer Observatory. Acedido a 31 de setembro, 2022. <https://gco.iarc.fr/>
- [3] Riggio AI, Varley KE, Welm AL. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. *Br J Cancer*. 2021;124(1):13-26. doi:10.1038/s41416-020-01161-4
- [4] Zuo H, Yang D, Yang Q, Tang H, Fu YX, Wan Y. Differential regulation of breast cancer bone metastasis by PARP1 and PARP2. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-15429-z
- [5] Comissão Europeia. Cancro. Publicado em 2021. Acedido a 15 de setembro, 2022. [https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/cancer\\_pt](https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/cancer_pt)
- [6] (US) NI of H, Study BSC. Understanding Cancer. Publicado *on-line* em 2007. Acedido a 15 de setembro, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- [7] Sistema Nacional de Saúde. Doenças oncológicas - o cancro. Publicado em 2022. Acedido a 16 de setembro, 2022. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/#sec-0>
- [8] Britannica. Cancer | Definition, Causes, Types, & Treatment | Britannica. Publicado em 2022. Acedido a 16 de setembro, 2022. <https://www.britannica.com/science/cancer-disease#ref224701>
- [9] Cancer Biology | NIH Intramural Research Program. Publicado em 2022. Acedido a 17 de setembro, 2022. <https://irp.nih.gov/our-research/scientific-focus-areas/cancer-biology>
- [10] Weston A, Harris CC. Multistage Carcinogenesis. Publicado em 2003. Acedido a 20 de setembro, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- [11] Tumor Promotion - an overview | ScienceDirect Topics. Acedido a 20 de setembro, 2022. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/tumor-promotion>
- [12] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, *et al.*. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1). doi:10.1038/s41572-019-0111-2
- [13] Polyak K. Breast cancer: Origins and evolution. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(11):3155-3163. doi:10.1172/JCI33295
- [14] Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):142-152. doi:10.1159/000430499
- [15] Bernardes A. Anatomia da mama feminina. Acedido a 20 de setembro, 2022. [http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap\\_33.pdf](http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap_33.pdf)
- [16] Ellis H, Mahadevan V. Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (United Kingdom)*. 2013;31(1):11-14. doi:10.1016/j.mpsur.2012.10.018
- [17] Goff SL, Danforth DN. The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2021;21(1):e63-e73. doi:10.1016/j.clbc.2020.06.011
- [18] Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017;50(1). doi:10.1186/s40659-017-0140-9
- [19] Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2(1). doi:10.1038/s41698-018-0047-0
- [20] Feng Y, Spezia M, Huang S, *et al.*. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018;5(2):77-106. doi:10.1016/j.gendis.2018.05.001
- [21] Fatah S, Northcutt L, Rafat M. Breast Cancer Metastasis to the Bone Microenvironment | Young Scientist Journal | Vanderbilt University. Acedido a 19 de setembro, 2022. <http://youngscientistjournal.org/youngscientistjournal/article/breast-cancer-metastasis-to-the-bone-microenvironment>
- [22] Akhtari M, Mansuri J, Newman KA, Guise TM, Seth P. Biology of breast cancer bone metastasis. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(1):3-9. doi:10.4161/cbt.7.1.5163
- [23] Britannica. bone - Chemical composition and physical properties. Publicado em 2022. Acedido a 21 de setembro, 2022. <https://www.britannica.com/science/bone-anatomy/Chemical-composition-and-physical-properties>
- [24] Wang L. Early diagnosis of breast cancer. *Sensors (Switzerland)*. 2017;17(7). doi:10.3390/s17071572
- [25] Vaquero JJ, Kinahan P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2015;17:385-414. doi:10.1146/annurev-bioeng-071114-040723
- [26] Mankoff DA, Katz SI. PET imaging for assessing tumor response to therapy. *J Surg Oncol*. 2018;118(2):362-373. doi:10.1002/jso.25114
- [27] Lawrentschuk N, Davis ID, Bolton DM, Scott AM. Functional imaging of renal cell carcinoma. *Nat Rev Urol*. 2010;7(5):258-266. doi:10.1038/nrurol.2010.40
- [28] Cherry SR, Gambhir S S, Gambhir SS. *Use of Positron Emission Tomography in Animal Research*. Acedido a 22 de setembro, 2022. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article-abstract/42/3/219/781216>
- [29] Wood KA, Hoskin PJ, Saunders MI. Positron Emission Tomography in Oncology: A Review. *Clin Oncol*. 2007;19(4):237-255. doi:10.1016/j.clon.2007.02.001
- [30] Miyaoka RS, Lehnert AL. Small Animal PET: A Review of What We Have Done and Where We Are Going. doi:10.1088/1361-6560/ab8f71
- [31] Yao R, Lecomte R, Crawford ES. Small-animal PET: What is it, and why do we need it? *J Nucl Med Technol*. 2012;40(3):157-165. doi:10.2967/jnmt.111.098632
- [32] Herschman HR. Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(4):378-384. doi:10.1016/S0952-7915(03)00066-9
- [33] Arosio V, Caccia M, Castro IF, *et al.*. easyPET: a novel concept for an affordable tomographic system. *Nucl Instrum Methods Phys Res A*. 2017;845:644-647. doi:10.1016/j.nima.2016.05.004

- [34] Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2019;321(3):288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323
- [35] Nakamura H, Maeda H. Cancer Chemotherapy. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*. Publicado on-line a 3 de março, 2022:401-427. doi:10.1007/978-1-4614-9164-4\_15
- [36] Zekria J, Mansour M, Karim SM. The anti-tumour effects of zoledronic acid. *J Bone Oncol*. 2014;3(1):25-35. doi:10.1016/j.jbo.2013.12.001
- [37] Fulton B, Spencer CM. Drug Evaluation. *A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of Metastatic Breast Cancer*. Vol 51.; 1996.
- [38] Lim PT, Goh BH, Lee WL. Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. *Paclitaxel: Sources, Chemistry, Anticancer Actions, and Current Biotechnology*. Publicado on-line a 1 de janeiro, 2022:47-71. doi:10.1016/B978-0-323-90951-8.00007-2
- [39] Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol*. 1995;22(4 Suppl 11):3-10. Acedido a 30 de setembro, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7481842/>
- [40] Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008;13(8):1551-1569. doi:10.3390/molecules13081551
- [41] Chan ESL, Cronstein BN. Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bull Hospital Jt Dis*. 2013;71 Suppl 1:S5-8. Acedido a 30 de setembro, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24219035/>
- [42] Stork CM, Schreffler SM. Cyclophosphamide. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. Publicado on-line a 4 julho, 2022:1111-1113. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00720-X
- [43] Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- [44] Coukell AJ, Faulds D, Bassar R, et al.. Epirubicin An Updated Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of Breast Cancer. *Drugs* 1997;53(3):453-82. doi:10.2165/00003495-199753030-00008
- [45] Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(7):440-446. doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
- [46] Agrawal K. Vincristine. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Publicado on-line a 7 de fevereiro, 2019:1-4. doi:10.1016/B978-008055232-3.62853-3
- [47] Findlay VJ, Scholar E. Trastuzumab. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Publicado on-line a 3 de abril, 2022:1-5. doi:10.1016/B978-008055232-3.63738-9
- [48] Narayanan P. Denosumab: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*. 2013;2(4):272. doi:10.4103/2278-330X.119895
- [49] Castellano D, Sepulveda JM, García-Escobar I, Rodríguez-Antolín A, Sundlov A, Cortes-Funes H. The Role of RANK-Ligand Inhibition in Cancer: The Story of Denosumab. *Oncol*. 2011; 16(2):136-145. doi:10.1634/theoncologist.2010
- [50] Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*. 2019;54(2):407-419. doi:10.3892/ijo.2018.4661
- [51] Shirakami Y, Shimizu M. Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. *Molecules*. 2018;23(9). doi:10.3390/molecules23092284
- [52] Dou QP. Molecular mechanisms of green tea polyphenols. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):827-835. doi:10.1080/01635580903285049
- [53] Przystupski D, Michel O, Rossowska J, Kwiatkowski S, Saczko J, Kulbacka J. The modulatory effect of green tea catechin on drug resistance in human ovarian cancer cells. *Medicinal Chemistry Research*. 2019;28(5):657-667. doi:10.1007/s00044-019-02324-6
- [54] Rahmani AH, al Shabrmi FM, Allemailem KS, Aly SM, Khan MA. Implications of green tea and its constituents in the prevention of cancer via the modulation of cell signalling pathway. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/925640
- [55] Comşa Ş, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35:3147-3154. Acedido a 15 de agosto, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26026074/>
- [56] Lee A v., Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(7). doi:10.1093/jnci/djv073
- [57] Camarillo IG, Xiao F, Madhivanan S, et al.. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. In: *Electroporation-Based Therapies for Cancer*. Elsevier; 2014:55-102. doi:10.1533/9781908818294.55
- [58] Arora M. Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*. 2013;3. doi:10.13070/mm.en.3.175
- [59] Merck KGaA. DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium. Publicado em 2022. Acedido a 4 de setembro, 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/dmem>
- [60] Nestler L, Evege E, Mclaughlin J, et al.. TrypLE™ Express: A Temperature Stable Replacement for Animal Trypsin in Cell Dissociation Applications.; 2004. Acedido a 4 de setembro, 2022. [https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/tryple-reagents.html?ef\\_id=CjwKCAjwtp2bBhAGEiwAOZZTu9ilCgNXTbTrnjoVzYP3m\\_0qeK6zW6V9l9tZnFoyPvfUfy9CniUlhoC6OUQA vD\\_BwE:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!590369314708!p!!g!!tryple!1759362861!70775284038&cid=bid\\_clb\\_cce\\_r01\\_co\\_cp0000\\_pjt0000\\_bid00000\\_ose\\_gaw\\_bt\\_pur\\_con&gclid=CjwKCAjwtp2bBhAGEiwAOZZTu9ilCgNXTbTrnjoVzYP3m\\_0qeK6zW6V9l9tZnFoyPvfUfy9CniUlhoC6OUQAvD\\_BwE](https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/tryple-reagents.html?ef_id=CjwKCAjwtp2bBhAGEiwAOZZTu9ilCgNXTbTrnjoVzYP3m_0qeK6zW6V9l9tZnFoyPvfUfy9CniUlhoC6OUQA vD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!590369314708!p!!g!!tryple!1759362861!70775284038&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_ose_gaw_bt_pur_con&gclid=CjwKCAjwtp2bBhAGEiwAOZZTu9ilCgNXTbTrnjoVzYP3m_0qeK6zW6V9l9tZnFoyPvfUfy9CniUlhoC6OUQAvD_BwE)
- [61] Agência Nacional para a Cultura Científica e Tecnológica. *Métodos de Quantificação de Fitoplâncton*. Acedido a 4 de setembro, 2022. [https://webstorage.cienciaviva.pt/public/pt.cienciaviva.io/recursos/files/cianobacterias\\_quantificacao\\_5409328775c1a2.pdf](https://webstorage.cienciaviva.pt/public/pt.cienciaviva.io/recursos/files/cianobacterias_quantificacao_5409328775c1a2.pdf)
- [62] Merck KGaA. Trypan Blue Powder Cell Viability Gold Standard Sigma-Aldrich. Publicado em 2022. Acedido a 30 de agosto, 2022. [https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/t6146?gclid=EAlaIqObChMIl9mduobb-QVJl1oCR13pgS2EAAYASAAEgLhS\\_D\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/t6146?gclid=EAlaIqObChMIl9mduobb-QVJl1oCR13pgS2EAAYASAAEgLhS_D_BwE)

- [63] Monteiro C. *EGCG do chá verde-um agente natural contra o cancro da mama*. Publicado em 2018. Acedido a 30 de agosto, 2022. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwieupi5q5r7AhXjh\\_0HHebtDjMQFnoECBAQAQ&url=https%3A%2F%2Festudogeral.uc.pt%2Fbitstream%2F10316%2F86237%2F1%2FTese%2520Christie%2520Monteiro.pdf&usg=AOvVaw2JFwA1LpDTt-eBEhgGkRrP](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwieupi5q5r7AhXjh_0HHebtDjMQFnoECBAQAQ&url=https%3A%2F%2Festudogeral.uc.pt%2Fbitstream%2F10316%2F86237%2F1%2FTese%2520Christie%2520Monteiro.pdf&usg=AOvVaw2JFwA1LpDTt-eBEhgGkRrP)
- [64] Albain KS, Nag SM, Calderillo-Ruiz G, et al.. Gemcitabine plus paclitaxel versus paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(24):3950-3957. doi:10.1200/JCO.2007.11.9362
- [65] Heinemann V. Gemcitabine plus cisplatin for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2002;3(Suppl. 1). doi:10.3816/CBC.2002.s.006
- [66] BC Cancer. *BC Cancer Protocol Summary for Neoadjuvant or Adjuvant Therapy for Breast Cancer Using Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel and Trastuzumab*.; 2021. Acedido a 30 de agosto, 2022. [www.bccancer.bc.ca/terms-of-use](http://www.bccancer.bc.ca/terms-of-use)
- [67] BC Cancer. *BC Cancer Protocol Summary for Neoadjuvant or Adjuvant Therapy for Breast Cancer Using Docetaxel and Cyclophosphamide*.; 2021. Acedido a 1 de setembro, 2022. [www.bccancer.bc.ca/terms-of-use](http://www.bccancer.bc.ca/terms-of-use)
- [68] Seidman AD. Gemcitabine and Docetaxel in Metastatic Breast Cancer. *Oncology*. 2004;18(14 Suppl 12):13-6. Acedido a 1 de setembro, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15685820/>
- [69] BC Cancer. *BC Cancer Protocol Summary for Adjuvant Therapy for High-Risk Breast Cancer Using Cyclophosphamide (Oral), Methotrexate and Fluorouracil*.; 2020. Acedido a 1 de setembro, 2022. [www.bccancer.bc.ca/terms-of-use](http://www.bccancer.bc.ca/terms-of-use)
- [70] Daubiné F, le Gall C, Gasser J, Green J, Clézardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(4):322-330. doi:10.1093/jnci/djk054
- [71] Cancer Therapy Advisor. *Bone Cancer Treatment Regimens*.; 2021. Acedido a 1 de setembro, 2022. <https://www.cancertherapyadvisor.com/home/cancer-topics/bone-cancer/bone-cancer-treatment-regimens/bone-cancer-treatment-regimens-clinical-trials/>
- [72] Lilly E, Markossian S, Grossman A, et al. *Assay Guidance Manual*.; 2021. Acedido a 1 de setembro, 2022. <https://ncats.nih.gov/expertise/preclinical/agm>
- [73] Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res*. 2016;65:S441-S453. doi:10.33549/physiolres.933526
- [74] Hoffman RM. Nude Mouse. In: *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier; 2017. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.06825-4
- [75] Ray G, Banerjee S, Saxena NK, Campbell DR, van Veldhuizen P, Banerjee SK. Stimulation of MCF-7 tumor progression in athymic nude mice by 17 $\beta$ -estradiol induces WISP-2/CCN5 expression in xenografts: A novel signaling molecule in hormonal carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2005;13(3):445-448. doi:10.3892/OR.13.3.445/HTML
- [76] Frenkel M, Abrams DI, Ladas EJ, et al.. Integrating dietary supplements into cancer care. *Integr Cancer Ther*. 2013;12(5):369-384. doi:10.1177/1534735412473642
- [77] Loening AM, Gambhir SS. *AMIDE: A Free Software Tool for Multimodality Medical Image Analysis*.; 2003. Acedido a 20 de setembro, 2022. [www.synngo.com](http://www.synngo.com)
- [78] Gunderson II, Tepper JE. *Clinical Radiation Oncology*. Publicado em 2016. Acedido a 1 de setembro, 2022. [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=NmFyCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+Radiation+Oncology+\(Fourth+Edition\)&ots=nxUlg6k9GF&sig=wDvFln8PD\\_EYN5oXlmyyC56dfnY&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=NmFyCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+Radiation+Oncology+(Fourth+Edition)&ots=nxUlg6k9GF&sig=wDvFln8PD_EYN5oXlmyyC56dfnY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [79] Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde - Universidade de Coimbra. *Radiofármaco: 18F-FDG*. Acedido a 4 de setembro, 2022. [https://www.uc.pt/icnas/quem\\_somos/organizacao/PET/pet\\_tipos\\_de\\_exames/exames\\_pet\\_fdg/radiofarmaco\\_fdg](https://www.uc.pt/icnas/quem_somos/organizacao/PET/pet_tipos_de_exames/exames_pet_fdg/radiofarmaco_fdg)
- [80] Santos PA. *PET/CT em oncologia contributo para a avaliação do seu interesse clínico usando moléculas marcadas com Flúor-18*.; 2017. Acedido a 4 de setembro, 2022. <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/43605>
- [81] Cook GJR, Fogelman MBB. *The Role of Positron Emission Tomography in the Management of Bone Metastases*.; 2000. doi:10.1002/1097-0142
- [82] Martins O, Gonçalves JF. Cetamina em Cuidados Paliativos Oncológicos: Um Desafio Experiência de um Serviço. *Med Interna (Bucur)*. 2021;27(1):28-32. doi:10.24950/o/280/19/1/2020
- [83] Wixson SK. Anesthesia and Analgesia. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Publicado on-line a 1 de janeiro, 1994:87-109. doi:10.1016/B978-0-12-469235-0.50012-9
- [84] Shi XX, Yin BS, Yang P, et al.. Xylazine activates adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway in the central nervous system of rats. *PLoS One*. 2016;11(4). doi:10.1371/journal.pone.0153169
- [85] Anesthesia (Guideline) | Vertebrate Animal Research. Acedido a 7 de setembro, 2022. <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>
- [86] Tahari AK, Chien D, Azadi JR, Wahl RL. Optimum lean body formulation for correction of standardized uptake value in PET imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. 2014;55(9):1481-1484. doi:10.2967/jnumed.113.136986