



**Marisa Regina Reduto
Barbeira**

**Variações inter individuais genéticas da
citotoxicidade associada aos estrogénios**



**Marisa Regina Reduto
Barbeira**

**Variações inter individuais genéticas da
citotoxicidade associada aos estrogénios**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e da Professora Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos, Professora Catedrática da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT e do FSE, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

O júri

Presidente	Doutor Fernando José Mendes Gonçalves Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro
Orientador	Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
Co-Orientador	Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos Professora Catedrática da Universidade de Aveiro
Arguente	Doutora Fernanda da Conceição Domingues Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências Exactas da Universidade da Beira Interior

Agradecimentos

A realização deste trabalho envolveu directa ou indirectamente várias pessoas, às quais não posso deixar de expressar os meus profundos agradecimentos:

À Professora Doutora Luiza Granadeiro, orientadora deste trabalho, dirijo o meu profundo agradecimento. A sua orientação foi exemplar, não só ao longo do trabalho experimental como na sua redacção. Agradeço por ter acreditado em mim e ter-me proposto o trabalho que agora apresento. Agradeço também a sua disponibilidade, dedicação, atenção e partilha de conhecimentos científicos. O meu sincero muito obrigado.

À Professora Doutora Maria Ana Santos, co-orientadora deste trabalho, agradeço o seu interesse e preocupação no desenrolar dos trabalhos. Muito obrigada pelo seu apoio e palavras de incentivo.

Á minha colega e amiga Ana Cristina Ramalinho quero agradecer o envolvimento que teve neste trabalho. Por tudo o que me ensinou, pelo tempo que dispensou a ajudar-me. Estas minhas palavras não conseguem expressar a minha gratidão e amizade.

À minha colega e amiga Margarida Xavier agradeço a sua disponibilidade na recolha de amostras, amizade e companheirismo.

Às pessoas com quem partilhei o laboratório nos últimos tempos, em especial, ao Luís e à Elisa.

Agradeço a todos os outros amigos e colegas a quem não me referi, mas que sempre me presentearam com um sorriso ou uma palavra amiga e que, por isso, foram e continuarão a ser importantes para mim.

Para finalizar, gostaria de expressar um sentimento especial para com a minha família. Aos meus pais agradeço por serem os meus melhores amigos e me terem ajudado nos momentos mais difíceis. Ao meu irmão agradeço todo o apoio e amizade dedicada.

Ao Paulo um obrigada muito especial, pelo seu amor, carinho e palavras de coragem para seguir em frente. Sei que em qualquer fase da minha vida poderei contar com a sua ajuda. Obrigada, simplesmente, por tudo.

Palavras-chave

Fibroblastos de gengiva humana, estradiol, resveratrol

Resumo

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em relação aos estrogénios e às suas acções no organismo, principalmente devido ao uso da terapia hormonal de substituição. Os flavonóides, como o resveratrol, têm uma estrutura idêntica aos estrogénios e alguns são descritos como antioxidantes e outros como pro-oxidantes, existindo alguma controvérsia relativamente a este assunto.

O objectivo deste trabalho foi investigar a resposta dos fibroblastos de gengiva humana aos efeitos do estradiol e do resveratrol.

Este estudo foi realizado em culturas celulares de fibroblastos de gengiva humana de diferentes indivíduos. A proliferação e a citotoxicidade foram avaliadas através do método colorimétrico MTT e a expressão da proteína Bcl-xl pelo método Western Blot.

Os resultados do nosso estudo demonstraram a existência de variabilidade inter individual da citotoxicidade ao estradiol. Os fibroblastos de gengiva humana, parecem constituir um modelo para o estudo da resposta aos estrogénios, com possível aplicação no estudo inter individual de risco e ajuste terapêutico em candidatas à terapia hormonal de substituição.

Também verificámos que, a presença de resveratrol potencia o efeito tóxico do estradiol, parecendo não apresentar um efeito celular protector.

Keywords

Human gingival fibroblasts, estradiol, resveratrol

Abstract

In the last years has increased the interest, in relation to oestrogens and to its actions in the organism, mainly due to the use of hormone replacement therapy. Flavonoids like resveratrol have similar structure to estrogens and were described as anti-oxidants in some systems, but as pro-oxidants in others, and controversy exists regarding this subject. The aim of this work was, to investigate the response of the human gingival fibroblasts to the effects of estradiol and resveratrol. The study is being performed in cultured gingival fibroblasts from different individuals. Proliferation and cytotoxicity were evaluated by MTT colorimetric assay and Bcl-xl protein expression by Western Blot. The results of our study demonstrate the existence of interindividual variability in estradiol cytotoxicity. The human gingival fibroblasts seem to constitute a model for the study of the response to estrogens, with possible applications in interindividual risk study and therapeutic adjust to female applicants, for the hormone replacement therapy. We also verified that resveratrol enhances the toxic effect of estradiol, seeming not to exert a protector effect in the cells.

ÍNDICE GERAL

	<u>PÁGINA</u>
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE QUADROS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A MENOPAUSA.....	2
1.2 A UTILIZAÇÃO DA TERAPIA HORMONAL DE SUBSTITUIÇÃO NA MENOPAUSA.....	3
1.3 HORMONAS ESTERÓIDES.....	5
1.3.1 ESTRADIOL.....	5
1.4 SÍNTESE DE ESTRADIOL.....	7
1.5 METABOLISMO DOS ESTROGÉNIOS.....	9
1.6 FUNÇÕES DOS ESTROGÉNIOS.....	10
1.7 RECEPTORES DE ESTROGÉNIO.....	10
1.8 MECANISMO DE ACÇÃO DOS ESTROGÉNIOS.....	11
1.8.1 ACÇÃO GENÓMICA.....	11
1.8.2 ACÇÃO NÃO GENÓMICA.....	12
1.9 COMPOSTOS FLAVONÓIDES.....	13
1.9.1 ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES.....	14
1.9.2 FONTES ALIMENTARES DE FLAVONÓIDES.....	15
1.9.3 ABSORÇÃO E METABOLISMO DOS FLAVONÓIDES.....	15
1.9.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS FLAVONÓIDES.....	16
1.9.5 RESVERATROL.....	17
1.10 MORTE CELULAR: NECROSE E APOPTOSE.....	18
1.10.1 MECANISMOS CELULARES DA APOPTOSE.....	19
1.10.2 CONTROLO DA APOPTOSE: FAMÍLIA BCL-2.....	20
1.11 TECIDO GENGIVAL E FIBROBLASTOS.....	21
2. OBJECTIVO	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 AMOSTRA POPULACIONAL.....	23
3.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	23
3.3 CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS.....	24
3.4 ENSAIOS COM RESVERATROL, 17- β -ESTRADIOL E 17- β -ESTRADIOL-BSA.....	24
3.5 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	25
3.5.1 MÉTODO DO MTT.....	25
3.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	26

	<u>PÁGINA</u>
3.6.1	MÉTODO WESTERN BLOT..... 26
3.6.1.1	Extracção de proteínas..... 26
3.6.1.2	Electroforese e electrotransferência..... 26
3.6.1.3	Bloqueio e incubação da membrana com anticorpo primário e secundário..... 27
3.6.1.4	Deteccção do sinal..... 27
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
4.1	OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DO EFEITO DO ESTRADIOL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA..... 28
4.1.1	ESTRADIOL <i>VERSUS</i> PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO..... 28
4.1.2	ESTRADIOL <i>VERSUS</i> PASSAGEM CELULAR..... 34
4.1.3	ESTRADIOL <i>VERSUS</i> NÚMERO DE CÉLULAS..... 35
4.2	ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS EM 4.1..... 37
4.3	EFEITO INTER INDIVIDUAL DO ESTRADIOL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA..... 38
4.3.1	SÉRIE CELULAR DO INDIVÍDUO MX 38
4.3.2	SÉRIE CELULAR DO INDIVÍDUO CO 39
4.3.3	SÉRIE CELULAR DO INDIVÍDUO MRS..... 43
4.4	ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS EM 4.3..... 46
4.5	EFEITO GENÓMICO DO ESTRADIOL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS GENGIVA HUMANA..... 48
4.6	EFEITO DO RESVERATROL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA..... 52
5.	CONCLUSÃO 55
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS 55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

LISTA DE ABREVIATURAS

<u>ABREVIATURA</u>	<u>NOME COMPLETO</u>
17- β -HSD	17- β -deshidrogenase
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	17 β -estradiol
E ₂	17 β -estradiol
Ebsa	17- β -estradiol-albumina sérica bovina
EDTA	Ácido Na-etilenodiaminatetraacético
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ER	Receptor de estrogénio
ER α	Receptor de estrogénio <i>alpha</i>
ER β	Receptor de estrogénio <i>beta</i>
ERE	[<i>Estrogen response element</i> (Elemento responsivo do receptor de estrogénio)]
<i>et al.</i>	E colaboradores
FBS	Soro bovino fetal
Hcl	Ácido clorídrico
HEPES	N- [2-hydroxyethyl] piperazine-N' - [2-ethane-sulfonic acid]
HRT	[<i>Hormone replacement therapy</i> (Terapia hormonal de substituição)]
HSPs	[<i>Heat shock proteins</i> (Proteínas de choque térmico)]
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PSA	Persulfato de amónia
R	Resveratrol
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TNF-R1	<i>Tumor necrosis factor receptor-1</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
Figura 1	Estrutura do estradiol..... 5
Figura 2	Síntese de estradiol a partir do colesterol (adaptado de Mitrunen <i>and</i> Hirvonen, 2003)..... 8
Figura 3	Acção genómica do estradiol (adaptado de Laura <i>et al.</i> , 2006)..... 12
Figura 4	Estrutura dos flavonóides 14
Figura 5	Esquema das várias fases da apoptose..... 18
Figura 6	Constituição do dente 21
Figura 7	Morfologia das células de fibroblastos humanos 22
Figura 8	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂)..... 41
Figura 9	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E ₂)..... 44
Figura 10	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição a 1nM de estradiol (E ₂) e 8mg/ml de resveratrol (R)..... 53

ÍNDICE DE QUADROS

	<u>PÁGINA</u>
Quadro 1	Alguns dos sintomas apresentados na menopausa..... 2
Quadro 2	Resultados da proliferação celular e expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular dos indivíduos CO e MRS..... 48

ÍNDICE DE TABELAS

	<u>PÁGINA</u>
Tabela 1	Constituição do gel de resolução e do gel de concentração a utilizar no sistema de eletroforese..... 27
Tabela 2	Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 30 minutos, 10 horas, 14 horas e 16 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 2nM, 12nM, 24nM, 60nM e 120nM) de estradiol (E ₂)... 28
Tabela 3	Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 1..... 29
Tabela 4	Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 30 minutos, 2 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E ₂)..... 30
Tabela 5	Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 2..... 31
Tabela 6	Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 3..... 32
Tabela 7	Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 4..... 33
Tabela 8	Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT na série celular MX, a partir de um número diferente de células (EXP.1 e EXP.2), após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂)..... 35
Tabela 9	Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂)..... 38
Tabela 10	Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂)..... 39
Tabela 11	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondentes à série celular do indivíduo CO, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECF TM 42
Tabela 12	Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200 nM e 400nM) de estradiol (E ₂)..... 43
Tabela 13	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondentes à série celular do indivíduo MRS, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECF TM 45
Tabela 14	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl dimerizada, 45

	correspondentes à série celular do indivíduo MRS, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECF TM	
Tabela 15	Resultados das absorvências, obtidas pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana dos indivíduos MX e CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa).....	48
Tabela 16	Resultados das absorvências, obtidas pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa).....	50
Tabela 17	Resultados das absorvências, obtidas pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e 8mg/ml de resveratrol (R).....	52
Tabela 18	Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl e da sua dimerização, correspondentes à série celular do indivíduo MX, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECFTM	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<u>PÁGINA</u>	
Gráfico 1	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 30 minutos, 10 horas, 14 horas e 16 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 2nM, 12nM, 24nM, 60nM e 120nM) de estradiol (E ₂).....	29
Gráfico 2	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, para as primeiras 6 horas de exposição, com diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E ₂).....	31
Gráfico 3	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E ₂).....	32
Gráfico 4	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E ₂).....	33
Gráfico 5	Resultados do estudo de proliferação celular realizado com células da série celular MX da 1 ^a para a 2 ^a passagem celular, após um período de exposição de 24 e 48 horas, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂). ..	34
Gráfico 6	Resultados do estudo de proliferação celular realizado com células da série celular MX da 2 ^a para a 3 ^a passagem celular, após um período de exposição de 24 e 48 horas, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂). ..	35
Gráfico 7	Resultados das experiências 1 e 2 (EXP.1 e EXP.2), na série celular do indivíduo MX, após 24 horas de incubação, com diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂).....	36
Gráfico 8	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂). Resultados para n=1.....	38
Gráfico 9	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E ₂). Os resultados correspondem à média ± erro padrão para n=2. * P <0,034 quando comparado com o controle e ** P <0,004 quando comparado com o controle.....	40

Gráfico 10	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E₂). Resultados para n=1.....	43
Gráfico 11	Resultados da diferença do estudo de proliferação celular da série correspondente aos indivíduos MX e CO, das 24 para as 48 horas de exposição, com as concentrações de 1nM e 50nM de estradiol (E₂).....	46
Gráfico 12	Resultados da proliferação celular, em diferentes séries celulares (MX e CO), após 24 e 48 horas de exposição, com diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).....	47
Gráfico 13	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa). Os resultados correspondem à média ± erro padrão para n=2.....	49
Gráfico 14	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa). Os resultados correspondem à média ± erro padrão para n=2. * P <0,034 quando comparado com o controlo e ** P <0,004 quando comparado com o controlo.....	50
Gráfico 15	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa).....	51
Gráfico 16	Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e 8mg/ml de resveratrol (R). Resultados para n=1.....	52

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em relação aos estrogénios e às suas acções no organismo, principalmente, devido ao uso da terapia hormonal de substituição na menopausa.

Neste período, a maioria das mulheres sente a sua qualidade de vida reduzida, devido às alterações emocionais, físicas e psicológicas, pelas quais passa. Simultaneamente, a falta de informação ou mesmo informações distorcidas, pelos meios de comunicação, faz com que uma parcela significativa de mulheres vivencie esta etapa da sua vida como uma doença, independentemente da sintomatologia apresentada (Brumel *et al.*, 2000). É nesta perspectiva, a de melhorar a qualidade de vida na menopausa que, actualmente, milhões de mulheres optam ou não pela terapia hormonal de substituição. Encontram-se descritos na literatura os benefícios, riscos, efeitos indesejáveis, indicações e contra-indicações da sua utilização (Brumel *et al.*, 2003). Desta forma, apesar de ser descrita como um dos tratamentos de eleição, para diminuir os sintomas apresentados na menopausa, é necessário ter em consideração os riscos e/ou benefícios, quando utilizada a médio ou longo prazo. A sua contínua utilização dependerá da manutenção dos benefícios para os quais foi iniciada, do aparecimento de efeitos adversos e da melhoria da qualidade de vida da mulher na menopausa.

O objectivo deste trabalho de investigação consistiu em estudar a resposta dos fibroblastos de gengiva humana aos efeitos do estradiol e do resveratrol, de forma a verificar se estes constituem um modelo viável para estudos genéticos inter individuais de resposta aos estrogénios, de modo a que possam ser aplicados no estudo individual de risco e ajuste terapêutico, em candidatas à terapia hormonal de substituição na menopausa.

Inicialmente, neste trabalho de investigação, é apresentada uma revisão da literatura sobre os conteúdos em questão, seguida do objectivo de estudo, população e métodos realizados, bem como, apresentação dos resultados e sua discussão. Finalmente, são referidas as principais conclusões e sugestões para futuras investigações, nesta área.

1.1 A MENOPAUSA

A definição literal de menopausa é o término do ciclo de hemorragias menstruais da mulher (Rico *et al.*, 2002). Caracteriza-se pelo cessar do período fértil, em que os ovários, naturalmente, param de funcionar e de produzir estrogênio e progesterona (Brincat *et al.*, 2005; Hickey *et al.*, 2005). Surge nas mulheres ocidentais, em média, aos cinquenta anos de idade, sendo designada de precoce quando antecede os quarenta anos de idade e tardia quando surge depois dos cinquenta e cinco anos (Rico *et al.*, 2002). Irregularidades menstruais, alterações sexuais ao nível dos órgãos genitais, envelhecimento da pele, alterações cardiovasculares, como enfartes do miocárdio e desenvolvimento de doenças ósseas, como a osteoporose, são alguns dos efeitos associados à diminuição das concentrações de estradiol (Brumel *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Blumel *et al.*, 2002). O quadro 1 refere alguns dos sintomas apresentados, neste período.

SINTOMAS APRESENTADOS NA MENOPAUSA
<u>Sintomas vasomotores</u> : afrontamentos, calores súbitos e sudação.
<u>Sintomas psíquicos</u> : humor depressivo, insónias e irritabilidade.
<u>Sintomas urogenitais</u> : incontinência urinária, secura da vagina e dificuldades sexuais.
<u>Sintomas cardiovasculares</u> : aumento da pressão arterial, do colesterol e pré-cordialgias.
<u>Outros sintomas</u> : aumento de peso, modificação da pele e do cabelo e dores ósseas.

Quadro 1: Alguns dos sintomas apresentados na menopausa.

1.2 A UTILIZAÇÃO DA TERAPIA HORMONAL DE SUBSTITUIÇÃO NA MENOPAUSA

A terapia hormonal de substituição [*hormone replacement therapy* (HRT)] refere-se tecnicamente à substituição de estrogénio e progesterona, através de comprimidos, injeção ou adesivos transdérmicos. Durante a menopausa, não só os níveis de estradiol [(E₂) (E)] são quase nulos como também a expressão do receptor de estrogénio (ER) sofre uma diminuição. Contudo, a substituição do estrogénio pela HRT induz a expressão de ER e eleva a concentração da hormona, a níveis próximos dos que se verificam durante o ciclo menstrual normal (Nelson *et al.*, 2001).

A osteoporose é considerada uma das doenças mais importantes associadas à menopausa. A HRT tem vindo a ser administrada para a sua prevenção e tratamento (Stevenson *et al.*, 2001; Cano *et al.*, 2002; Aznárez *et al.*, 2003). Os estrogénios contribuem para a estimulação do crescimento ósseo, na fase da puberdade, e para a manutenção da massa óssea normal, inibindo a actividade da hormona paratiróide na actividade dos osteoclastos (Rod, 1997). Desta forma, a circulação dos estrogénios exerce um efeito protector sobre o osso e um efeito positivo sobre a homeostasia do cálcio, aumentando a sua absorção no intestino e reduzindo a sua excreção renal (Yasui *et al.*, 2001; Aznárez *et al.*, 2003). Durante a menopausa, o efeito protector dos estrogénios decresce e, conseqüentemente, podem ocorrer fracturas (Stevenson, 2005). Vários estudos (Mosekilde *et al.*, 2002; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002; Women's Health Initiative Steering Committee, 2004) salientam a utilização da HRT na redução do risco de fracturas, neste período.

Na menopausa, a qualidade da pele deteriora-se devido a uma diminuição na síntese de estrogénio que exerce funções na estrutura dos componentes da pele, nomeadamente do colagénio. Vários estudos (Arkadiusz *et al.*, 2003; Angelo, 2005; Brincat *et al.*, 2005) referem a utilização da HRT como benéfica na prevenção do envelhecimento da pele.

Estudos de Brumel (2000) e Genazzani (2002) salientam uma influência positiva da utilização da HRT na função sexual das mulheres e, Hickey (2005), refere que o tratamento com HRT reduz os sintomas vasomotores apresentados na menopausa.

Alterações cardiovasculares, tais como enfartes do miocárdio, aumento da pressão arterial e pré-cordialgias, podem surgir neste período (Banks *et al.*, 2004; Misso *et al.*, 2005). Vários estudos relacionados com a prevenção primária ou secundária de doenças cardiovasculares (Grodstein *et al.*, 2000; Beral *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2004; Naftolin *et al.*, 2004), concluem que a HRT não deve ser administrada, porque a sua utilização aumenta a incidência de riscos cardiovasculares. Contrariamente, a conferência do Congresso da Sociedade Europeia de Menopausa refere a utilização de HRT como uma medida de prevenção para o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Relativamente à associação da HRT com o cancro do útero e da mama, os primeiros estudos publicados datam de 1984 (Upton, 1984); os estudos subsequentes apresentam resultados contraditórios (Hickey *et al.*, 2005).

1.3 HORMONAS ESTERÓIDES

O estrogénio, progesterona, testosterona, mineralocorticóides, glucocorticóides são exemplos de hormonas esteróides lipossolúveis e hidrofóbicas com baixo peso molecular (Thresia *et al.*, 2004). Estas hormonas derivam de um precursor comum, o colesterol e são sintetizadas em diversos tecidos: ovários, testículos, placenta e córtex adrenal (Simpson *et al.*, 2001). Após serem segregadas, pelas glândulas endócrinas são transportadas até aos seus locais de acção, através da circulação sanguínea (Thresia *et al.*, 2004). No plasma podem associar-se a proteínas como, por exemplo, globulinas ligantes de hormonas sexuais e a albumina que lhes permitem ultrapassar o problema da sua lipossolubilidade (Thresia *et al.*, 2004, Tsuchiya *et al.*, 2005).

1.3.1 ESTRADIOL

O estradiol, designado quimicamente por 1,3,5-estratrieno-3,17 β -diol ou 17 β -estradiol, é uma hormona esteróide constituída por átomos de carbonos e um anel fenólico (figura 1). Apresenta a fórmula molecular $C_{18}H_{24}O_2$ e o peso molecular de 272.39 g/mol.

É secretado para a corrente sanguínea, onde 98% circula ligado a globulinas ligantes de hormonas sexuais e, em menor quantidade, a outras proteínas plasmáticas como a albumina (Gruber *et al.*, 2002).

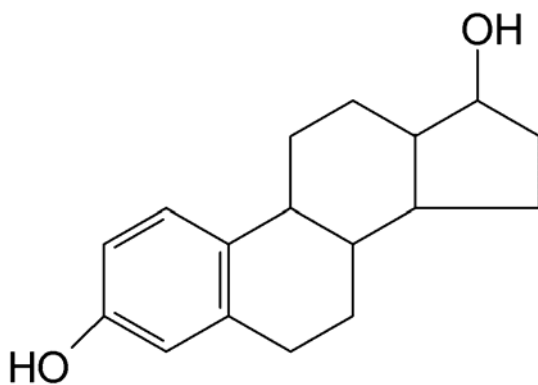


Figura 1: Estrutura do estradiol.

Esta hormona esteróide monofenólica é o estrogénio natural mais potente produzido, principalmente, pelos folículos de Graff do ovário e pela placenta e, em quantidades mais reduzidas, pelas cápsulas supra-renais e pelos testículos (Thresia *et al.*, 2004).

Em mulheres com ciclos menstruais normais, a secreção de estradiol tem um padrão cíclico bifásico com a concentração mais alta imediatamente antes da ovulação. O aumento da concentração de estradiol exerce uma influência por feedback positivo ao nível da hipófise, estimulando a secreção de gonadotropinas, a hormona estimuladora do folículo e a hormona luteinizante, que são essenciais para a maturação do folículo e para a ovulação, respectivamente. Após ovulação, os níveis de estradiol decaem rapidamente até à activação das células lúteas, resultando numa subida menos pronunciada de estradiol na fase lútea (Rod, 1997). Durante a gravidez, os níveis de estradiol, no plasma materno, aumentam consideravelmente, superando os níveis máximos pré-ovulatórios e são mantidos durante toda a gestação.

As medições de estradiol plasmático são um índice valioso para a caracterização de várias disfunções menstruais, tais como: a puberdade precoce e tardia, amenorreia primária e secundária e a menopausa. Em casos de esterilidade, medições de estradiol plasmático são úteis para a verificação da indução de ovulação, a seguir aos tratamentos (Miki *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em relação às suas acções no organismo, principalmente, devido aos riscos e/ou benefícios da utilização da HRT (Brumel *et al.*, 2003), como referido anteriormente. Muitos estudos, em diversas áreas, estão a ser realizados, a fim de esclarecer os efeitos benéficos ou prejudiciais do estradiol (Wise, 2002).

1.4 SÍNTESE DE ESTRADIOL

Em mulheres pré-menopáusicas não grávidas praticamente todos os estrogénios são sintetizados nos ovários, enquanto, após a menopausa a maioria dos estrogénios são formados, por aromatização da androstenediona a estrona, no tecido adiposo periférico (Siiteri, 1997).

O produto inicial para que ocorra a biossíntese de esteróides é o colesterol tal como se pode observar na figura 2. A biossíntese dos estrogénios envolve uma série de reacções enzimáticas que convertem o colesterol em androgénios e estrogénios. As enzimas CYP11A, CYP17 e CYP19 são particularmente importantes na síntese do estradiol; também a 3 β -HSD e a 17 β -HSD estão envolvidas, neste processo (Mitrunen *and* Hirvonen, 2003).

O colesterol, numa primeira fase, ao nível mitocondrial, é convertido em pregnenolona. A partir da pregnenolona ocorre a síntese de androstenediona, por duas vias distintas. Através da 17 β -deshidrogenase (17 β -HSD) e da androstenediona, obtida por qualquer das vias anteriores, obtém-se a testosterona. A aromatização, último passo no processo de formação de estrogénios, é catalisada pelas aromatases do complexo enzimático citocromo P450 que estão presentes no retículo endoplasmático liso (Labrie *et al.*, 2000; Gruber *et al.*, 2002). Essa etapa converte testosterona em estradiol e androstenediona em estrona (Simpson *and* Davis, 2001; Meinhardt, 2002).

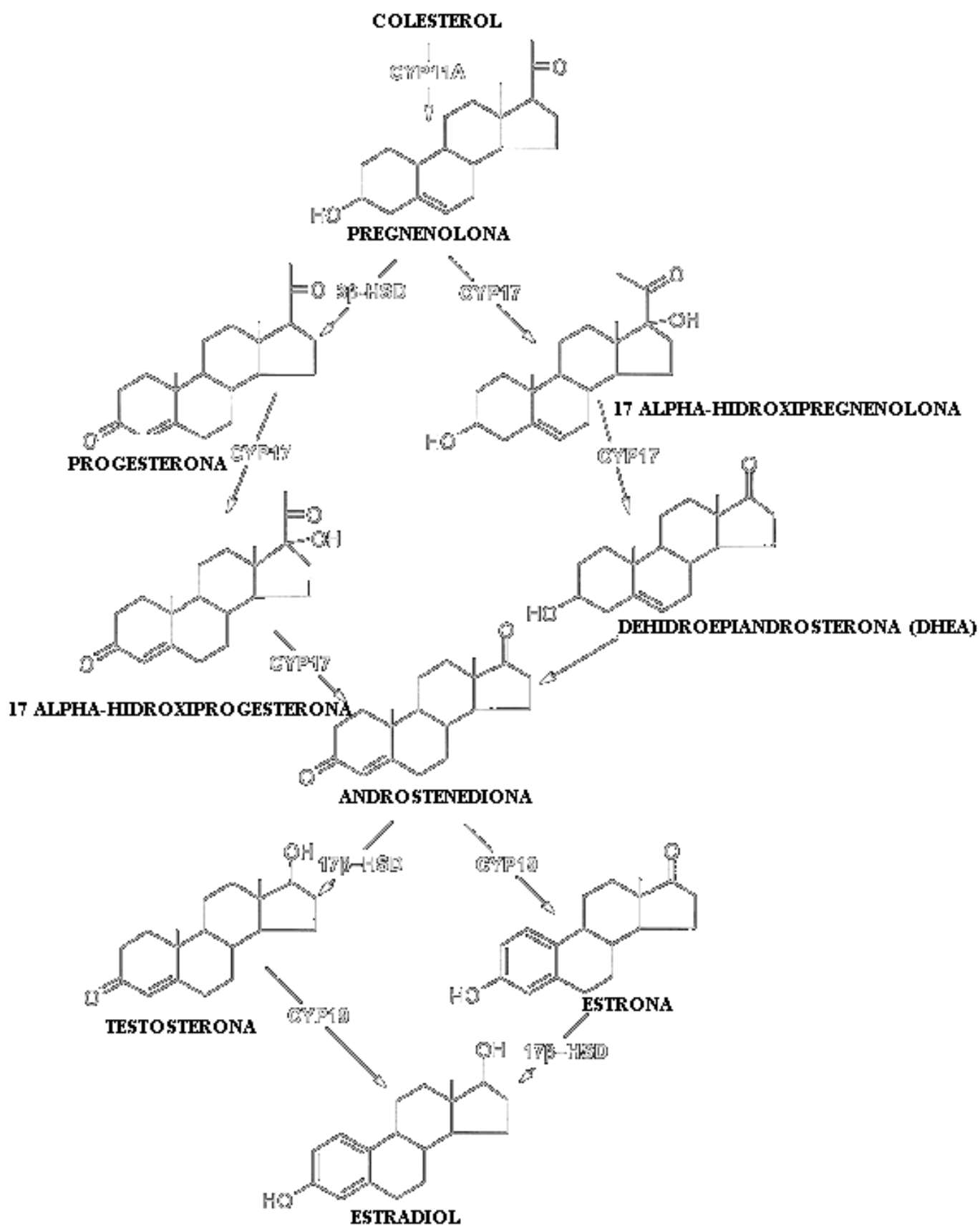


Figura 2: Síntese de estradiol a partir do colesterol (adaptado de Mitrunen *and* Hirvonen, 2003).

1.5 METABOLISMO DOS ESTROGÉNIOS

A metabolização dos estrogénios é realizada pelas enzimas CYP do complexo citocromo P450, que são abundantemente expressas no fígado (Tsuchiya *et al.*, 2005). Segundo Blom (2001), os estrogénios são metabolizados pelas sulfotransferases (sulfatação) ou pela UDP-glucuronosil-transferase (glucuronidação) e os conjugados são excretados na bÍlis e na urina. A hidrólise desses conjugados, pela flora intestinal, possibilita a subsequente reabsorção dos estrogénios, resultando numa recirculação entero-hepática. Os estrogénios, também, são metabolizados por hidroxilação e metilação, formando catecol estrogénios e metoxicatecol estrogénios, respectivamente.

No fígado, aproximadamente 80% do estradiol, é biotransformado em 2-hidroxiestradiol e 20% em 4-hidroxiestradiol (Tsuchiya *et al.*, 2005). O maior metabolito do estradiol, 2-hidroxiestradiol é, principalmente, catalizado por CYP1A2 e CYP3A4 no fígado e pelo CYP1A1 nos tecidos extra hepáticos. O CYP1B1 é responsável pela metabolização do estradiol em 4-hidroxiestradiol, em tecidos extra hepáticos, com elevada expressão desta enzima no útero, ovários e tecido mamário (Lee *et al.*, 2003). Em menor quantidade, outros metabolitos são formados, tais como: 6- α , 6- β , 7- α , 12- β , 15- α , 15- β , 16- α e 16- β hidroxiestrogénios, mediante a acção de várias enzimas, tais como: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7 (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002).

A metilação de 2-hidroxiestradiol e 4-hidroxiestradiol, através da catecol-O-metiltransferase (COMT) dá origem a metabolitos metoxilados (Gruber *et al.*, 2001). Por meio da COMT, 2-hidroxiestradiol é convertido em metabolitos 2-metoxiestradiol e o composto 4-hidroxiestradiol origina 4-metoxiestradiol.

Os catecol estrógenios são capazes de manter um processo de oxi-redução cíclico e contínuo, formando quinonas intermediárias (Gruber *et al.*, 2002). Devido à formação de radicais livres, durante esse processo, e a ligação covalente desses intermediários ao ácido desoxirribonucleico (DNA), os estrogénios podem apresentar actividade genotóxica (Liehr, 2000).

1.6 FUNÇÕES DOS ESTROGÉNIOS

Os estrogénios endógenos (17 β -estradiol, estrona e estriol) são responsáveis pela regulação de diversos processos fisiológicos em tecidos alvo, principalmente, nos órgãos do sistema reprodutivo, onde desempenham um papel importante no desenvolvimento, crescimento, diferenciação sexual e regulação da fertilidade. Actuam, também, no sistema nervoso central, urogenital, cardiovascular, esquelético e na pele (Jennifer *et al.*, 2000; Jennifer *et al.*, 2002). À semelhança das outras hormonas esteróides, exercem as suas acções biológicas através de um sistema de transdução de sinal que envolve proteínas receptoras (Jan *et al.*, 2004). Assim sendo, os seus efeitos são mediados por dois receptores nucleares distintos: receptor de estrogénio *alpha* (ER α) e receptor de estrogénio *beta* (ER β). Um ou ambos os receptores podem ser encontrados em qualquer célula alvo dos estrogénios (Wierman, 2007).

1.7 RECEPTORES DE ESTROGÉNIO

Foram clonadas e caracterizadas duas isoformas da proteína receptora para o estrogénio, denominadas de receptor de estrogénio *alpha* (ER α) e receptor de estrogénio *beta* (ER β) (Laura *et al.*, 2006). Estes receptores, pertencem à super família dos receptores nucleares que também incluem a 1,25-dihidróxido vitamina D, retinóides, hormonas da tiróide e prostaglandinas (Barbara De Servi *et al.*, 2005).

O subtipo clássico ou ER α foi clonado, inicialmente, em 1986, a partir de uma linhagem de células neoplásicas mamárias, enquanto o ER β foi isolado em 1996 (Stefan *et al.*, 2001). Estes receptores apresentam diferentes expressões nos vários tecidos do organismo. O ER α é predominantemente expresso em tecidos específicos, como a mama, útero e vagina, estando envolvido na regulação da reprodução. O ER β é expresso em vários tecidos, como o trato urinário, glândulas salivares, testículos, ovários, endométrio vascular e músculo liso, sistema nervoso central e sistema imunológico (Stefan *et al.*, 2001; Konrad *et al.*, 2005).

1.8 MECANISMOS DE ACÇÃO DOS ESTROGÉNIOS

A teoria clássica da acção das hormonas esteróides refere-se à sua acção ao nível do núcleo, em que os estrogénios através da ligação a receptores nucleares específicos, os receptores de estrogénio, desencadeiam as suas acções biológicas. Durante muitos anos, pensou-se que as hormonas esteróides actuavam exclusivamente a este nível, actualmente, está demonstrado que também apresentam um modo de acção não genómico (Gruber *et al.*, 2002).

1.8.1 ACÇÃO GENÓMICA

A acção genómica exercida pelo estradiol induz a uma sequência de mecanismos de transcrição genética, através dos receptores de estrogénio. Depois de atravessar a membrana celular, a hormona liga-se ao domínio de ligação hormonal do receptor que se encontra inactivo, devido à presença das proteínas de choque térmico [*heat shock proteins* (HSPs)]. Seguidamente, através da alteração conformacional, provocada pela separação das HSPs, ocorre a activação do complexo receptor de estradiol – estradiol (ER-E₂). Segue-se a dimerização do complexo ER-E₂ e acoplamento do dímero ao elemento responsivo do receptor de estrogénio [*estrogen response element* (ERE)], através dos dedos de zinco do domínio de ligação ao DNA (Liehr, 2000) (figura 3).

A resposta celular vai depender da natureza do receptor estrogénico e da sua prevalência nos diversos tecidos, da dimerização do receptor, formando homodímeros (dois receptores α ou dois receptores β) ou heterodímeros (um receptor α e um receptor β), do contexto celular das proteínas adaptadoras, que podem actuar como co-activadoras ou co-repressoras (Jan *et al.*, 2004). As proteínas co-activadoras possuem capacidade de aumentar a actividade transcripcional do receptor, enquanto as co-repressoras interagem com os receptores e competem com as proteínas co-activadoras (Gruber *et al.*, 2002). Este processo, induz a síntese de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) que se dirige para o citoplasma e inicia a síntese nos ribossomas, de novas proteínas. O resultado final da síntese de novas proteínas representa a resposta celular à hormona (Jan *et al.*, 2004).

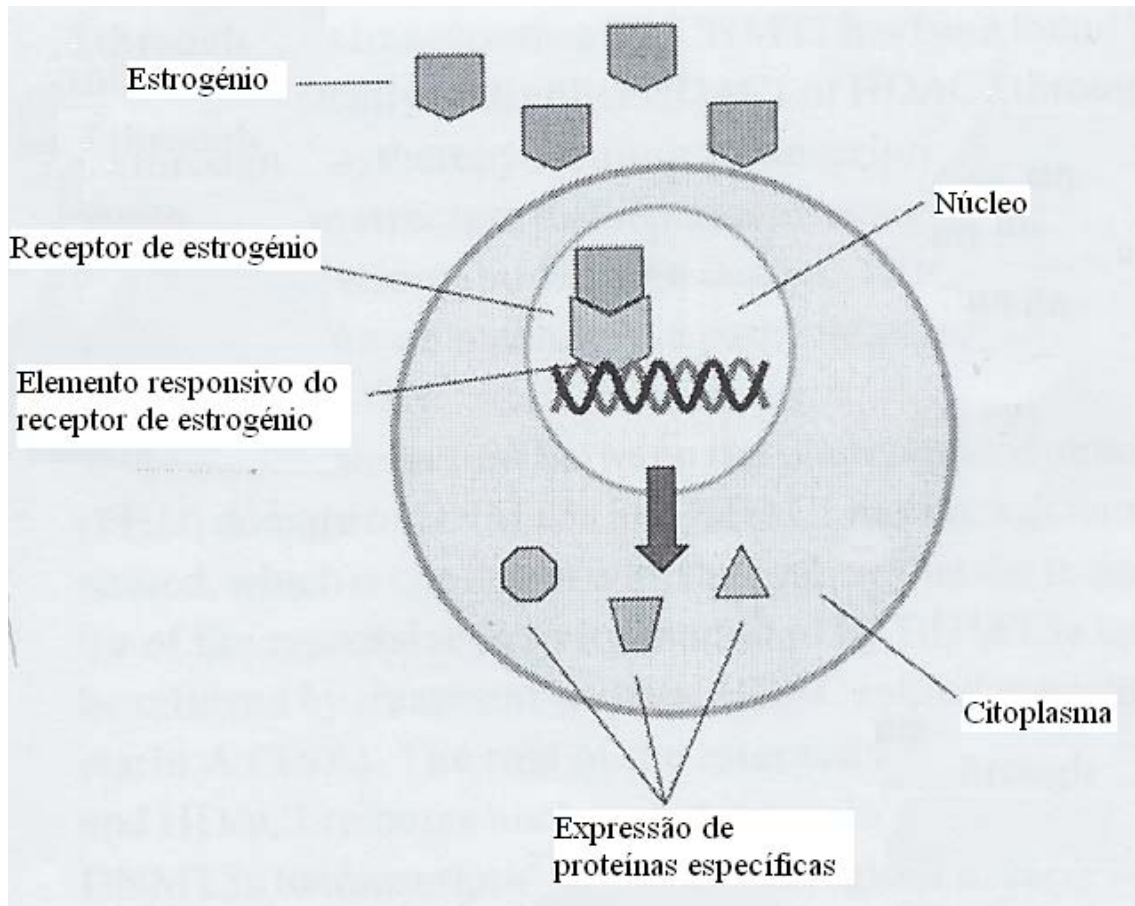


Figura 3: Acção genómica do estradiol (adaptado de Laura *et al.*, 2006).

1.8.2 ACÇÃO NÃO GENÓMICA

A acção não genómica é qualquer modo de acção que não implica directamente a acção de genes como, por exemplo, os efeitos das células nervosas induzidos pelas hormonas esteróides. Ao contrário dos efeitos genómicos, os efeitos não genómicos requerem a presença contínua de hormona (Liehr, 2000). É um processo que ocorre ao nível membranar, em que a parte intracelular da molécula receptora se associa na parte interna da membrana celular a uma proteína reguladora, a proteína G (Cheryl *et al.*, 2005). Após ligação da hormona esteróide ao seu receptor, a parte intracelular do receptor desencadeia fenómenos rápidos que conduzem a uma resposta intracelular (Jan *et al.*, 2004).

1.9 COMPOSTOS FLAVONÓIDES

Os polifenóis incluem mais de 8000 compostos conhecidos, desde fenóis mais simples como os ácidos fenólicos, passando pelos flavonóides até compostos de composição e complexidade variada, como os diarilheptanos. Os flavonóides são substâncias polifenólicas de baixo peso molecular, das quais fazem parte mais de 5000 compostos com uma estrutura idêntica à dos estrogénios (Ferguson, 2001). Para além da importância, na protecção das plantas contra factores ambientais e bióticos adversos, o reconhecido interesse pelos polifenóis está relacionado com o facto de muitos deles serem descritos como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimutagénicos e anticarcinogénicos (Ferguson, 2001). Verifica-se, em consequência das controvérsias presentes sobre o uso da HRT, que muitas mulheres optam por alternativas à sua utilização como, por exemplo, a actividade física e a reeducação alimentar, optando por alimentos ricos em cálcio, pobre em gordura saturada e com baixo teor calórico. Simultaneamente, a divulgação e a pesquisa sobre o uso da medicina complementar preconiza a prescrição de medicamentos não hormonais, para diminuir ou prevenir os sintomas na menopausa. Assim sendo, a fitoterapia e, dentro desta, os flavonóides, começam a ganhar espaço como modalidade de tratamento (Kessel *et al.*, 2004).

1.9.1 ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são constituídos por 3 anéis fenólicos (A, B e C) na sua estrutura básica, como se pode observar na figura 4. O anel A (anel de benzeno) está condensado com o C₆ do anel C que, na posição 2, tem ligado um anel fenilbenzeno (anel B).

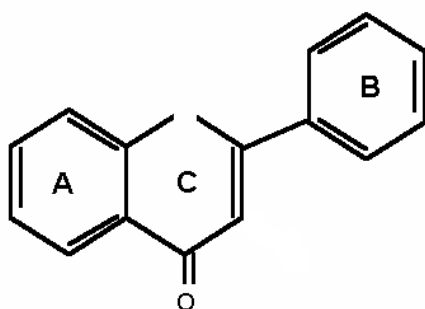


Figura 4: Estrutura dos flavonóides.

A sua estrutura básica, permite vários padrões de substituição, dando origem a uma grande variedade de compostos, dentro do grupo dos flavonóides (Aherne *and* O'Brien, 2002). Podem ser classificados em seis subclasses principais, dependendo dos substituintes do anel C (Ross *and* Kasum, 2002):

- ✓ Flavanois: possuem um grupo hidroxilo na posição 3. Por exemplo, catequina e epicatequina;
- ✓ Flavonóis: possuem um grupo carbonilo na posição 4, um grupo hidroxilo na posição 3 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Por exemplo, quercitina e quercitagetina;
- ✓ Flavonas: possuem um grupo carbonilo na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Por exemplo, rutina, apigenina e luteoleína;
- ✓ Antocianidinas: possuem um grupo hidroxilo na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigénio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4. Por exemplo, cianidina, petunidina e malvidina;
- ✓ Isoflavonóides: possuem um grupo carbonilo na posição 4 e o anel B encontra-se ligado à restante molécula através do carbono 3. Podem ainda possuir uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. Por exemplo, genisteína e coumestrol;
- ✓ Flavononas: possuem um grupo carbonilona na posição 4. Por exemplo, miricetina, hesperidina, naringina e naringenina.

1.9.2. FONTES ALIMENTARES DE FLAVONÓIDES

Os flavonóides são encontrados em quantidades significativas nos vegetais, frutos, sementes e em bebidas como o chá e o vinho (Ferguson, 2001). A maioria dos flavonóides presentes no vinho provém da uva, especialmente da sua pele e do seu processo de fermentação (Havsteen, 2002).

As fontes alimentares dos flavonóides podem variar, significativamente, de região para região, dependendo dos hábitos alimentares e das características culturais das populações (Aherne *and* O'Brien, 2002). O consumo de flavonóides glicosilados, através de uma dieta normal foi estimado entre 26mg/dia e 1g/dia (Hertog *et al.*, 1993; Formica *and* Regelson, 1995). A quercetina é um dos flavonóides maioritários na dieta, em 26mg/dia de flavonóides ingeridos cerca de 16mg são de quercetina.

1.9.3. ABSORÇÃO E METABOLISMO DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são designados glicosilados, quando ligados a açúcares, na ausência de resíduos de açúcar, designam-se aglicosilados. Estes compostos encontram-se, normalmente, nas plantas na forma glicosilada (Aherne *and* O'Brien, 2002), a mais ingerida na dieta (Walle, 2004; Yokomizo *and* Moriwaki, 2005). No seu metabolismo estão envolvidos órgãos como o fígado e o intestino delgado. A primeira etapa do metabolismo dos flavonóides glicosilados, ocorre na mucosa do intestino e envolve a actividade das β -glicosidases (O'Leary *et al.*, 2003). Os flavonóides que não são absorvidos no intestino delgado são metabolizados, pela microflora do cólon, originando moléculas aglicosiladas e ácidos fenólicos que, por sua vez, podem ser absorvidos ao nível do cólon (Hollman *et al.*, 1995; Manach *et al.*, 1998). Após absorção, os flavonóides conjugados com substratos endógenos (como o ácido glucurónico e sulfato) são transportados para o fígado, onde são metabolizados por reacções de hidroxilação e metilação, competindo com os estrogénios pelas mesmas vias de destoxificação.

1.9.4. EFEITOS BIOLÓGICOS DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides parecem desempenhar um papel importante nos ciclos redox da vida celular. Alguns, são descritos como antioxidantes e outros como pro-oxidantes (Pietta, 2000; Alia *et al.*, 2005)

Diversos autores, referem a importância dos flavonóides na protecção das células contra a citotoxicidade e genotoxicidade, induzida pelos radicais livres, o que ajuda a explicar o seu potencial benéfico na redução da ocorrência do cancro e outras patologias. Vários mecanismos foram propostos, entre os quais, a capacidade destes compostos actuarem como antioxidantes (Ross *and* Kasum, 2002), protegendo o DNA dos danos oxidativos e induzindo o sistema de reparação do mesmo. Dorai e Aggarwal (2004) referem a inibição da proliferação celular e a indução da morte celular programada, na presença de flavonóides.

Vários estudos têm demonstrado o efeito inibitório dos flavonóides na proliferação de diversos tipos celulares como, por exemplo, nas seguintes: células hepáticas (Ramos *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2005), células do cólon (Kuo *et al.*, 1997; Kuntz *et al.*, 1999), células do pâncreas (Mouria *et al.*, 2002), células do cancro do fígado (Son *et al.*, 2004), células do cancro da próstata (Gupta *et al.*, 2001; Tyagi *et al.*, 2002) e células do cancro gástrico (Yoshida *et al.*, 1990). A actividade antiproliferativa deve-se ao bloqueio da progressão do ciclo celular e/ou indução da morte celular por apoptose (Birt *et al.*, 2001; Son *et al.*, 2005).

Os flavonóides, em determinadas condições, apresentam efeitos citotóxicos que podem estar relacionados com as suas propriedades pro-oxidantes, (Valko *et al.*, 2006). As formas reduzidas dos flavonóides actuam como antioxidantes enquanto as formas oxidadas (radicais fenoxilos) têm actividade pro-oxidante. Galati e O'Brien (2004), no artigo de revisão sobre a toxicidade dos flavonóides, alertam para a necessidade de avaliar a toxicidade destes compostos no organismo, uma vez que o seu consumo não é controlado. Apesar deste assunto ser objectivo de alguns trabalhos já realizados, a toxicidade destes componentes alimentares, quando utilizados com fins terapêuticos, ainda não está totalmente esclarecida (Undeger, *et al.*, 2004; Alia *et al.*, 2005).

1.9.5 RESVERATROL

O resveratrol (R) é um polifenol que pode ser encontrado em vários frutos. É uma molécula conjugada por dois anéis fenil interligados por uma dupla ligação entre os carbonos do anel e ligações de 3 grupos OH inseridos nos anéis. É sintetizado sob duas formas isómeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Frémont, 2000).

As uvas são fontes abundantes de resveratrol, porque é sintetizado como resposta ao ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*). Devido ao processo de fabricação, o vinho tinto contém maior quantidade de resveratrol, comparativamente ao vinho branco e verde (Frémont, 2000).

Os mecanismos pelos quais o resveratrol exerce os seus efeitos benéficos são diversos. Entre eles destacam-se: a actividade antioxidante, anticarcinogénica e antimutagénica (Frémont, 2000; Schneider *et al.*, 2000; Oak *et al.*, 2005). Vários estudos (Benitez *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2007) referem a indução do processo de apoptose, por parte destes compostos. Também, são descritos como compostos que inibem a proliferação celular, porque atrasam o ciclo celular (Sharmila *et al.*, 2007).

A sua estrutura molecular semelhante à do estrogénio, permite evidenciar propriedades farmacológicas similares a esta hormona (Bradamante *et al.*, 2004).

1.10 MORTE CELULAR: NECROSE E APOPTOSE

A manutenção da homeostasia tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios como, por exemplo, a apoptose (Eguchi *et al.*, 2000). O termo apoptose foi utilizado, pela primeira vez, em 1972, pelos investigadores Wyllie Kerr e Currie, para indicar uma nova forma de morte celular, em que as células morriam de forma morfológicamente distinta da morte por necrose. A apoptose, também designada de morte celular programada, é um processo que ocorre de forma controlada e ordenada, contribuindo para o desenvolvimento e a manutenção da homeostasia dos tecidos (Lopaczynski *and* Zeisel, 2001). Distingue-se da morte celular por necrose, devido a um conjunto de características morfológicas e bioquímicas (Ferguson, 2001). Morfológicamente, a necrose caracteriza-se pelo aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática, seguida da consequente libertação dos conteúdos celulares, para o meio intercelular. Esta libertação do conteúdo celular das células mortas pode provocar lesões nas células vizinhas e resultar no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Chandra *et al.*, 2000). Durante a apoptose, salienta-se a exposição extracelular dos resíduos de fosfatidilserina, formação de vesículas na membrana celular (*blebs*), diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e, por último, a fragmentação da célula e formação de corpos apoptóticos (figura 5).

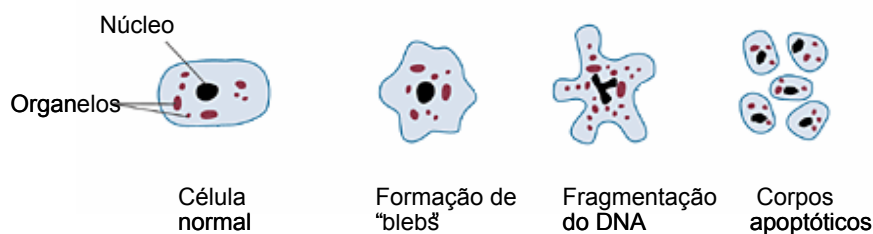


Figura 5: Esquema das várias fases da apoptose.

As alterações que ocorrem na superfície celular permitem que as células apoptóticas sejam imediatamente reconhecidas e fagocitadas. A rápida eliminação das células e o não extravasamento do conteúdo celular, justificam a ausência do processo inflamatório (típico da necrose) (Chandra *et al.*, 2000).

Durante o desenvolvimento humano a apoptose tem um papel importante, em particular, na morfogénese, diferenciação sexual, formação e maturação dos sistemas nervoso e imunitário. Além disso, apresenta-se crucial para a manutenção da homeostase tecidual no adulto (Eguchi *et al.*, 2000). Disfunções nos mecanismos de controlo do sistema de apoptose (apoptose deficiente ou excessiva) estão associadas a várias condições patológicas, tais como: imunodeficiência, doenças auto-imunes, doenças degenerativas (doença de alzheimer, doença de parkinson), cancro e infecções virais (Leist and Jaattela, 2001).

1.10.1 MECANISMOS CELULARES DA APOPTOSE

Existem duas vias pelas quais a apoptose pode ser induzida: a via apoptótica intrínseca ou mitocôndrial e a via apoptótica extrínseca (Ferri and Kroemer, 2001). A via apoptótica mitocôndrial pode ser desencadeada por vários estímulos, tais como: substâncias citotóxicas, radiação, choque térmico e pela privação de factores de crescimento indispensáveis à sobrevivência da célula (Slee *et al.*, 1999). A via apoptótica extrínseca é mediada por receptores membranares, designados de receptores de morte como, por exemplo, o TNF-R1 (*tumor necrosis factor receptor-1*) (Leist and Jaattela, 2001). Ambos os processos apoptóticos conduzem à activação de caspases, as quais amplificam o sinal apoptótico, levando à activação de outras caspases que são necessárias para a fase de execução celular.

1.10.2 CONTROLO DA APOPTOSE: FAMÍLIA BCL-2

O estudo molecular de uma anomalia cromossómica, associada a uma doença maligna humana, permitiu, em 1986, a identificação de um gene designado de Bcl-2, que codificava uma proteína bloqueadora da apoptose. Ao longo da última década, foram identificados vários genes humanos com semelhanças estruturais ao Bcl-2, todos eles envolvidos no controlo molecular da apoptose e colectivamente designados por “família Bcl-2” (Azevedo, 1999; Zimmermann *et al.*, 2001). A família Bcl-2 é constituída por proteínas anti-apoptóticas como, por exemplo, a Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1 e proteínas pro-apoptóticas como, por exemplo, a bcl-xs, Bax, Bak, Bad e Bid. As proteínas inibem a apoptose porque bloqueiam a libertação do citocromo c da mitocôndria (anti-apoptóticas) e, outras, favorecem a apoptose, promovendo a activação das procaspases e a morte celular (pró-apoptóticas) (Eguchi *et al.*, 2000; Ziwei, 2000; Ryungsa, 2005). O estado de permissividade ou resistência ao processo apoptótico resulta de um balanço entre os membros bloqueadores e promotores da apoptose (Azevedo, 1999).

A região transmembranar determina a localização sub celular da proteína, enquanto as regiões BH1, BH2, BH3 e BH4 (*bcl-2* homology regions) determinam as interacções proteicas entre os membros da família e eventuais interacções com outras proteínas. As principais antagonistas da apoptose, Bcl-2 e Bcl-xl, localizam-se, principalmente, na membrana mitocôndrial. Os membros pró-apoptóticos, da família Bcl-2, estão no citosol e, quando activados, translocam-se para a mitocôndria, onde interactivam com os membros anti-apoptóticos (Zimmermann *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 2002; Cande *et al.*, 2002). Os membros bloqueadores e promotores da apoptose interactivam entre si, através da constituição de homodímeros e de heterodímeros. Todas as proteínas bloqueadoras parecem funcionalmente equivalentes, nas formas de homodímeros ou de heterodímeros, contudo, a Bax só promove a apoptose na forma de homodímero e a Bad, quando heterodimerizada (Cande *et al.*, 2002; Boner, 2003; Jason O`Neill *et al.*, 2004). Os membros anti-apoptóticos, da família bcl-2, contêm quatro domínios homólogos, BH1-4. O domínio N-terminal BH4 é importante para a anti-apoptose, porque a deleção do BH4 converte a Bcl-2 numa molécula pró-apoptótica (Yelena *et al.*, 2003). As proteínas anti-apoptóticas, bcl-2 e bcl-xl, inibem a apoptose porque bloqueiam a actividade das proteínas pró-apoptóticas, no domínio BH3 como, por exemplo, na Bid e Bax (Benjamin *et al.*, 2002; Manabu *et al.*, 2005).

1.11 TECIDO GENGIVAL E FIBROBLASTOS

A gengiva é a parte da mucosa mastigatória que envolve a porção cervical dos dentes, como se pode observar na figura 6. A sua forma e textura são definitivas em associação com a erupção dos dentes.

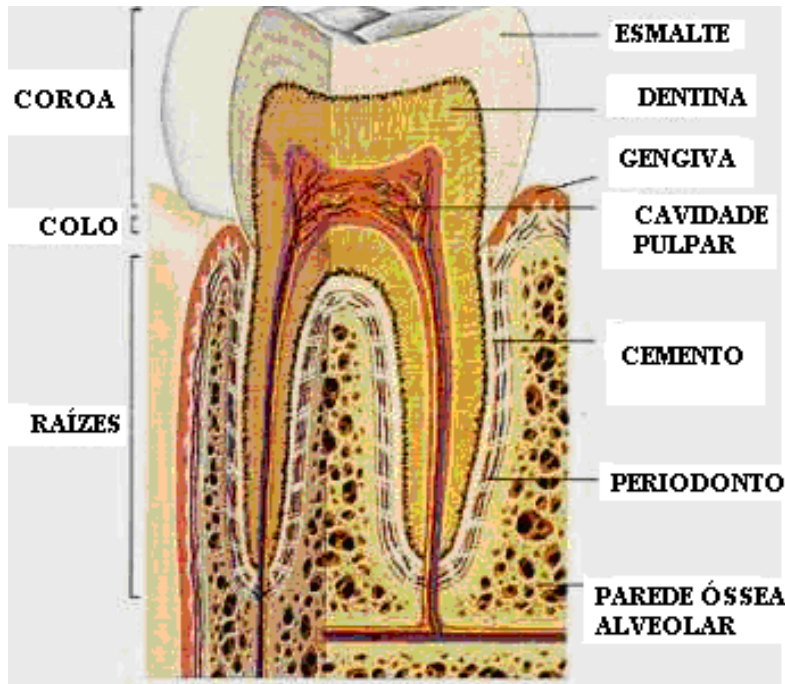


Figura 6: Constituição do dente.

O tecido conjuntivo é o componente tecidual predominante da gengiva e do ligamento periodontal. É constituído por células e material intercelular. O material intercelular é formado pela matriz e elementos fibrilares (Junqueira, 1999). As células do tecido conjuntivo são os fibroblastos, fibrócitos, plasmócitos, mastócitos, macrófagos e células adiposas (Henrikson *et al.*, 1997).

O fibroblasto é a célula mais frequente do tecido conjuntivo e tem como função a síntese de colagénio e proteoglicanos. É também responsável pela formação de fibras e material intercelular (Junqueira, 1999).

Caracteriza-se, morfológicamente, como uma célula com um tamanho relativamente grande, com prolongamentos citoplasmáticos e um núcleo ovóide com cromatina e nucléolos evidentes (figura 7) (LuDan Qu *et al.*, 2005).



Figura 7: Morfologia das células de fibroblastos humanos.

A literatura (Arkadiusz *et al.*, 2003; Jozef *et al.*, 2004; Angelo, 2005; LuDan Qu *et al.*, 2005) refere a cultura de fibroblastos, em estudos associados a hormonas sexuais, nomeadamente com estrogénios.

2. OBJECTIVO

Este trabalho tem como objectivo estudar a resposta dos fibroblastos de gengiva humana aos efeitos do 17- β -estradiol e do resveratrol.

Para atingir este objectivo, foram realizados estudos “*in vitro*” de proliferação celular e estudos de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xl.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA POPULACIONAL

O estudo foi realizado em três séries de células de fibroblastos de gengiva humana, de indivíduos diferentes. Estes foram seleccionados arbitrariamente, no âmbito de uma consulta de estomatologia e designados de MX, CO e MRS. A todos os indivíduos foi pedido consentimento, para utilização da sua amostra de gengiva, no estudo em questão. A amostra foi recolhida de acordo com as Normas de Ética do Código Deontológico.

3.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra de gengiva humana foi acondicionada e transportada em tubos *eppendorf*, com meio completo, constituído por meio RPMI 1640 suplementado com 2nM glutamina, 1nM piruvato, 1nM HEPES, 12% soro bovino fetal (FBS) e 1% antibiótico e antimicótico.

O tecido gengival foi submetido a uma digestão enzimática com 0,3% tripsina-EDTA, durante 30 minutos, a 37°C em banho-maria, sob agitação constante. A suspensão resultante foi centrifugada e o seu *pellet* ressuscitado e fragmentado. Os fragmentos resultantes, com o tamanho de aproximadamente 2mm, foram cultivados em placas *multiwells*, em meio completo, a 37°C e atmosfera húmida, a 5% de CO₂.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS

As culturas primárias de fibroblastos humanos foram mantidas em meio completo que foi mudado cada dois ou três dias. Quando as culturas entraram em confluência foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e tripsinizadas com 0,3% tripsina-EDTA. A suspensão resultante foi centrifugada, o sobrenadante decantado, as células ressuspensas em meio completo e contadas. Posteriormente, foram cultivadas em placas *multiwells*, em meio completo, a 37°C e atmosfera húmida, a 5% de CO₂.

3.4 ENSAIOS COM RESVERATROL, 17-β-ESTRADIOL E 17-β-ESTRADIOL-BSA

Os ensaios experimentais foram realizados a partir de culturas em confluência, em meio incompleto, constituído por meio RPMI 1640 suplementado com 2nM glutamina, 1nM piruvato, 1nM HEPES e 1% antibiótico e antimicótico.

Antes da realização dos ensaios laboratoriais com 17-β-estradiol, 17-β-estradiol-bsa (Ebsa) e resveratrol, foram preparadas, em meio incompleto, as diferentes concentrações das soluções a utilizar. O composto 17-β-estradiol foi dissolvido em 0,1% de etanol e o 17-β-Estradiol-bsa em 0,08% de dimetilsulfóxido (DMSO).

As culturas de fibroblastos humanos foram incubadas com as diferentes concentrações (variaram entre 1 e 400nM) de 17-β-estradiol, com diferentes concentrações (variaram entre 1 e 400nM) de 17-β-estradiol-bsa e com 8mg/ml de resveratrol. Todos os ensaios laboratoriais foram realizados na presença de um controlo, que correspondeu à presença de células de fibroblastos, em meio de cultura incompleto, na ausência dos compostos a estudar.

Posteriormente, foram realizados ensaios de proliferação celular e estudos de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xl.

3.5 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.5.1 MÉTODO DO MTT

A proliferação celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}. O princípio do teste baseia-se na absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto designado de *formazan*. Este produto é acumulado dentro da célula e extraído através da adição de um solvente apropriado. A quantidade de *formazan* produzido é proporcional ao número de células vivas (David, 2003).

Nos ensaios de viabilidade celular, adicionou-se, a cada alvéolo das placas *multiwells*, 300µl de MTT (0,5mg/ml). Estas foram colocadas a incubar a 37°, durante 2 horas e 30 minutos. Os cristais de *formazan* foram dissolvidos em 300µl de uma solução 0,04M Hcl em isopropanol, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. A absorvência foi medida num leitor de micro placas a 570nm, utilizando um filtro de referência de 620nm.

Nos ensaios de proliferação celular, o controlo correspondeu a 100% de proliferação celular, sendo a percentagem de proliferação celular determinada através da seguinte fórmula:

$$PC = (A \times 100) / C$$

LEGENDA:

PC - Percentagem da proliferação celular

A – Absorvência da amostra

C – Absorvência do controlo

3.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

3.6.1 MÉTODO WESTERN BLOT

Os ensaios de Western Blot foram realizados com 10µg de proteínas totais, submetidas a electroforese em gel de acrilamida a 12%, durante 60 minutos e transferidas para uma membrana de PVDF, durante 45 minutos. Após bloqueio, fez-se reagir a membrana com o anticorpo primário anti-Bcl-xl (1:1000) e com o respectivo anticorpo secundário (1:10000). A membrana foi submetida a um processo de *stripping*, de forma a poder reagir com o anticorpo primário anti-β-actina (1:2000) e correspondente anticorpo secundário. A imunodeteção das proteínas foi realizada no sistema ECFTM (Amersham Biosciences) (Li *et al.*, 2007).

3.6.1.1 Extracção de proteínas

Adicionou-se, a cada alvéolo das placas *multiwells*, 50µl de meio de Lise Completo, constituído por 25mM Tris, 2,5mM EDTA, 2,5mM EGTA, 1% Triton X-100, 1mM DDT, 1mM PMSF e 25µg/ml leupeptina, para lisar completamente as células de fibroblastos humanos. Simultaneamente, efectuou-se uma raspagem vigorosa, de forma a obter as proteínas correspondentes a cada ensaio laboratorial.

Posteriormente, realizaram-se os ensaios de Western Blot com 10µg de proteínas totais, que foram desnaturadas na proporção 1:6, com solução desnaturante, antes de serem aplicadas no gel de electroforese.

3.6.1.2 Electroforese e electrotransferência

Foi preparado no sistema de electroforese um gel de resolução a 12% e de concentração de 4%, cuja constituição se encontra descrita na tabela 1, que correu a 160 V, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Em seguida, efectuou-se a electrotransferência para uma membrana PVDF a 4°C, 750 mA, durante 45 minutos.

SOLUÇÃO ADICIONAR	GEL RESOLUÇÃO 12%	GEL CONCENTRAÇÃO 4%
Água	3,4ml	6,1ml
Acrilam/Bis 30%	4ml	1,3ml
Gel buffer	2,5ml – 1,5M Tris – HCL pH 8,8	2,5ml – 0,5M Tris – HCL pH 6,8
SDS 10%	100µl	100µl
TEMED	5µl	10µl
PSA10%	50µl	50µl

Tabela 1: Constituição do gel de resolução e do gel de concentração a utilizar no sistema de eletroforese.

3.6.1.3 Bloqueio e incubação da membrana com anticorpo primário e secundário

Procedeu-se ao bloqueio da membrana com TBS-T 5% leite (100ml de TBS, 5g de leite em pó e 0,1ml de Tween), durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Após o bloqueio, fez-se reagir a membrana com anticorpo primário, durante 1 hora, à temperatura ambiente ou durante a noite, a 4°C, sob agitação constante.

Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T 0,5% leite (100ml de TBS 10×, 5g de leite em pó e 1ml de Tween, perfazer até 1L de água destilada), sob agitação constante, durante 15 minutos, três vezes.

Posteriormente, foi incubada durante, 1 hora, à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C, sob agitação constante, com o respectivo anticorpo secundário. Depois foi lavada três vezes, durante 15 minutos com TBS-T 0,5% leite, sob agitação constante.

3.6.1.4 Detecção do sinal

Colocou-se 600µl de reagente ECF, em contacto com a membrana, durante o tempo máximo de 5 minutos. Revelou-se a presença de proteínas, através da detecção de fluorescência no sistema ECFTM (Amersham Biosciences).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. As diferenças estatísticas, dentro de cada tipo de tratamento foram, determinadas através do programa SPSS, versão 15.0 (2006), com o teste “*T de Student*” para amostras independentes ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DO EFEITO DO ESTRADIOL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA

4.1.1 ESTRADIOL *VERSUS* PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos em valores de absorvência do estudo de proliferação celular, realizado pelo método MTT, para diferentes concentrações de estradiol, após um período de exposição de 30 minutos, 10 horas, 14 horas e 16 horas.

TEMPO	CONCENTRAÇÕES (nM) de E ₂						
	Controlo	1E ₂	2E ₂	12E ₂	24E ₂	60E ₂	120E ₂
30 Minutos	0,044	0,038	0,039	0,051	0,055	0,051	0,049
	0,044	0,041	0,039	0,055	0,056	0,054	0,053
10 Horas	0,041	0,043	0,047	0,053	0,057	0,045	0,040
	0,036	0,043	0,048	0,053	0,057	0,041	0,042
14 Horas	0,037	0,046	0,049	0,045	0,042	0,057	0,053
	0,037	0,035	0,049	0,042	0,044	0,056	0,053
16 Horas	0,058	0,057	0,054	0,043	0,067	0,053	0,038
	0,049	0,060	0,056	0,047	0,075	0,052	0,039

Tabela 2: Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 30 minutos, 10 horas, 14 horas e 16 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 2nM, 12nM, 24nM, 60nM e 120nM) de estradiol (E₂).

Considerámos, para cada um dos tempos de incubação com estradiol, o controlo como 100% de viabilidade celular. Comparámos os resultados das diferentes concentrações de estradiol e períodos de exposição com o mesmo.

Observámos, através das linhas de tendência, apresentadas no gráfico 1 e na tabela 3 que nas primeiras 16 horas de exposição ao estradiol, não ocorreram variações na proliferação celular, com excepção das concentrações de 60 e 120nM de estradiol, as quais provocaram uma diminuição da proliferação.

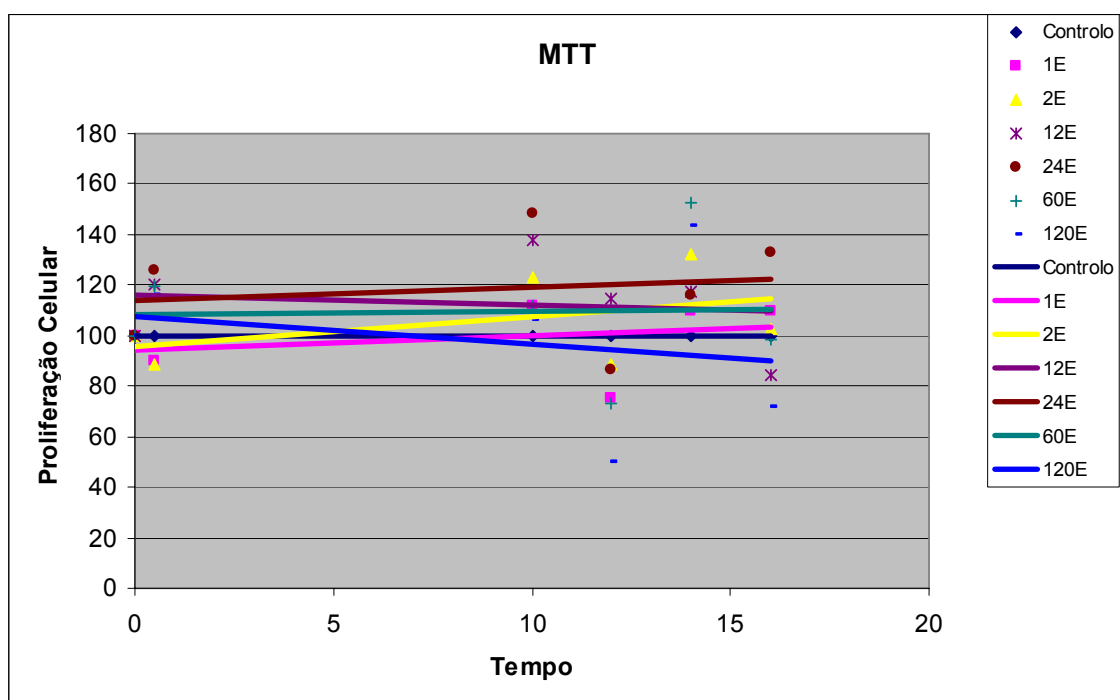


Gráfico 1: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 30 minutos, 10 horas, 14 horas e 16 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 2nM, 12nM, 24nM, 60nM e 120nM) de estradiol (E_2).

CONCENTRAÇÕES (nM) de E_2	EQUAÇÃO DA LINHA DE TENDÊNCIA
Controlo	$Y=100$
$1E_2$	$Y=0,5706X+94,219$
$2E_2$	$Y=1,1655X+95,754$
$12E_2$	$Y=0,4127X+115,98$
$24E_2$	$Y=0,5192X+113,73$
$60E_2$	$Y=0,1303X+108,01$
$120E_2$	$Y=-1,1055X+107,61$

Tabela 3: Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 1.

A tabela seguinte (tabela 4) apresenta os resultados obtidos em valores de absorvência do estudo de proliferação celular, pelo método MTT, para diversas concentrações de estradiol, após 30 minutos, 2 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas de exposição com o composto.

TEMPO	CONCENTRAÇÕES (nM) de E ₂						
	Controlo	1E ₂	3E ₂	12E ₂	24E ₂	48E ₂	60E ₂
30 Minutos	0,149	0,121	0,119	0,124	0,124	0,127	0,131
2 Horas	0,104	0,115	0,104	0,112	0,122	0,134	0,113
6 Horas	0,119	0,111	0,105	0,141	0,142	0,115	0,103
24 Horas	0,065	0,082	0,088	0,087	0,098	0,083	0,110
48 Horas	0,096	0,090	0,085	0,096	0,075	0,090	0,100

Tabela 4: Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 30 minutos, 2 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas de exposição a diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E₂).

Considerámos, para cada um dos tempos de exposição, o controlo como 100% de viabilidade celular. Comparámos os resultados das diferentes concentrações de estradiol e períodos de exposição com o mesmo.

Observámos, através das linhas de tendência, apresentadas no gráfico 2 e na tabela 5 que nas primeiras 6 horas de exposição com estradiol, foi evidente um aumento da proliferação celular, para as diferentes concentrações utilizadas. Contudo, na presença de 3 e 60nM de estradiol, verificou-se uma diminuição da proliferação celular.

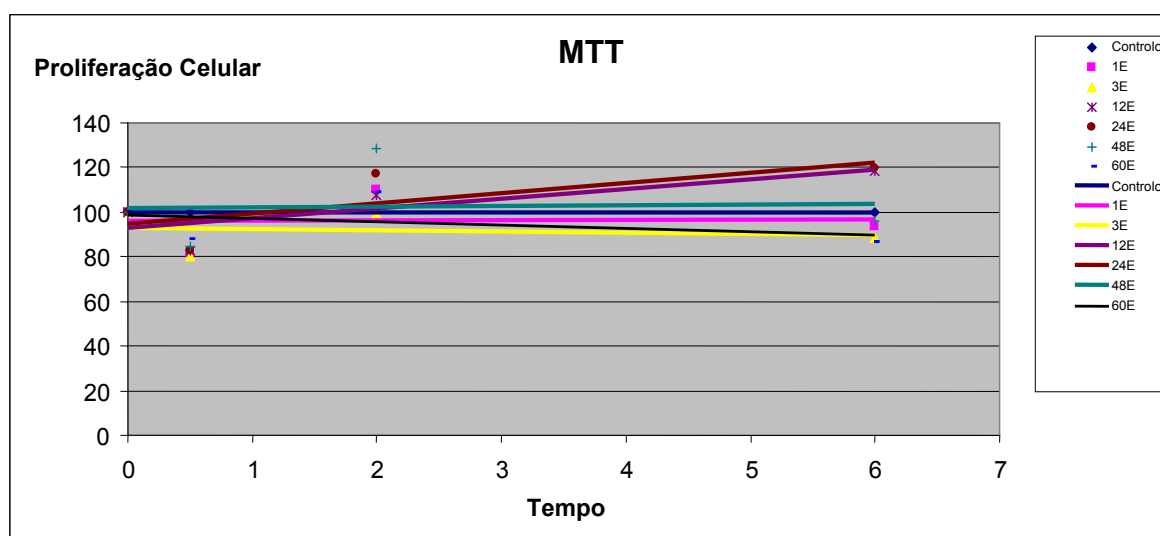


Gráfico 2: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, para as primeiras 6 horas de exposição, com diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E₂).

CONCENTRAÇÕES (nM) de E ₂	EQUAÇÃO DA LINHA DE TENDÊNCIA
Controlo	Y= 100
1E ₂	Y= 0,1453X+95,837
3E ₂	Y= -0,5774X+93,132
12E ₂	Y= 4,3655X+92,885
24E ₂	Y= 4,5342X+95,125
48E ₂	Y= 0,2857X+101,76
60E ₂	Y= -1,4876X+98,859

Tabela 5: Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 2.

Após um período de 24 horas de incubação com estradiol, observou-se, através das linhas de tendência, apresentadas no gráfico 3 e na tabela 6, um aumento da proliferação celular, para todas as concentrações utilizadas.

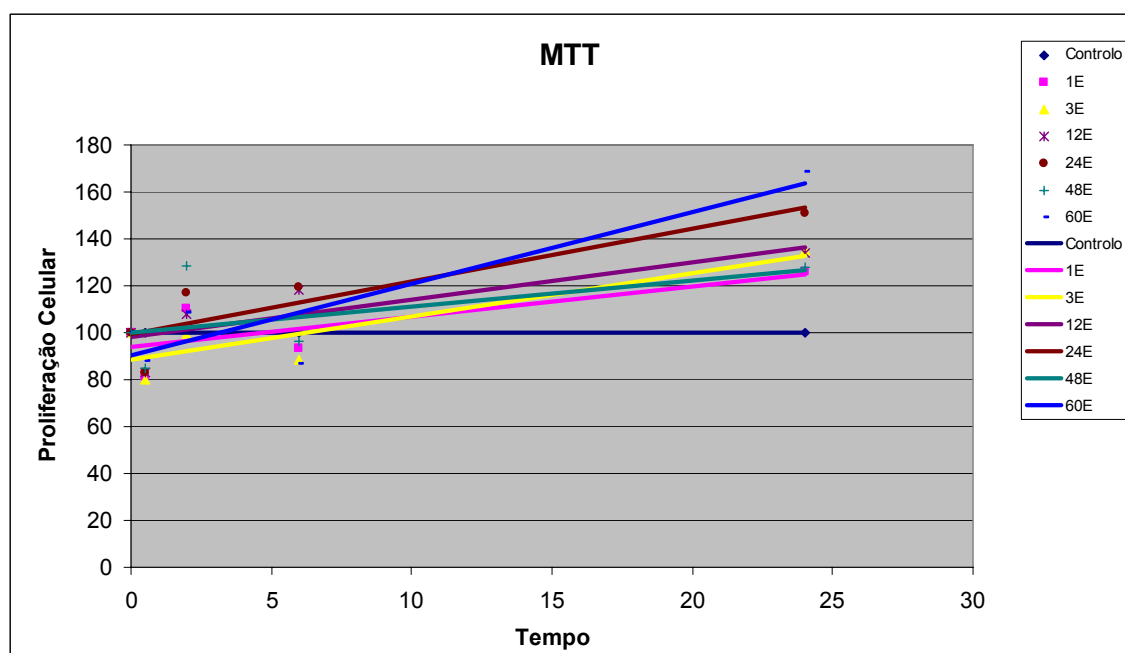


Gráfico 3: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E₂).

CONCENTRAÇÕES (nM) de E	EQUAÇÃO DA LINHA DE TENDÊNCIA
Controlo	Y= 100
1E ₂	Y= 1,3046X+93,667
3E ₂	Y= 1,8471X+88,595
12E ₂	Y= 1,6083X+98,045
24E ₂	Y= 2,2364X+99,425
48E ₂	Y= 1,1098X+100,22
60E ₂	Y= 3,0626X+90,344

Tabela 6: Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 3.

Observou-se, através das linhas de tendência apresentadas no gráfico 4 e na tabela 7, após um período de 48 horas de incubação com estradiol, uma diminuição da proliferação celular, para a maioria das concentrações em questão.

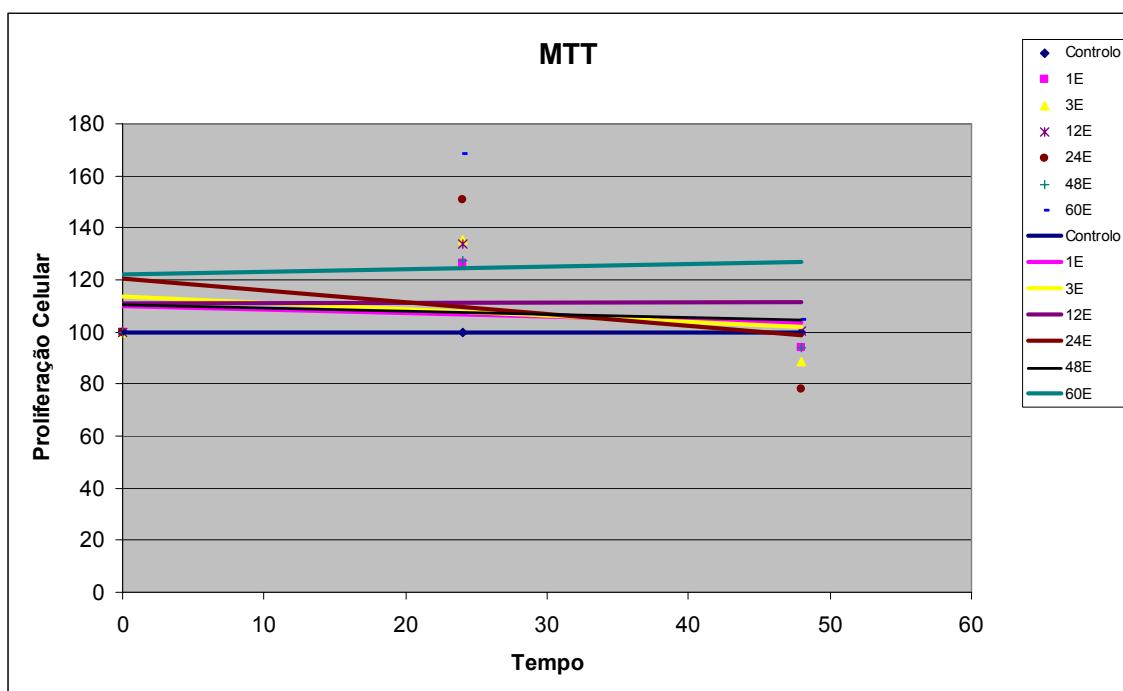


Gráfico 4: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM, 3nM, 12nM, 24nM, 48nM e 60nM) de estradiol (E₂).

CONCENTRAÇÕES (nM) de E	EQUAÇÃO DA LINHA DE TENDÊNCIA
Controlo	$Y = 100$
1E ₂	$Y = -0,1309X + 109,77$
3E ₂	$Y = -0,24X + 113,71$
12E ₂	$Y = 0,0109X + 111,19$
24E ₂	$Y = -0,4581X + 120,59$
48E ₂	$Y = -0,12X + 110,19$
60E ₂	$Y = 0,0982X + 122,04$

Tabela 7: Equações das linhas de tendência apresentadas no gráfico 4.

4.1.2 ESTRADIOL *VERSUS* PASSAGEM CELULAR

Realizámos estudos de proliferação celular em passagens celulares diferentes, com células da série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX. A experiência A (EXP.A) foi efectuada com células da primeira para a segunda passagem (1-2) e a experiência B (EXP.B) com células da segunda para a terceira passagem (2-3). O gráfico 5 corresponde aos resultados de proliferação celular da experiência A e o gráfico 6 aos resultados obtidos na experiência B. Observámos, em ambos os gráficos, em relação às concentrações de 1 e 50nM de estradiol, um aumento da proliferação celular, após 24 horas de exposição, bem como, uma diminuição no final das 48 horas de exposição. Desta forma, verificou-se uma consistência nos resultados obtidos, independentemente da passagem celular em que a experiência foi realizada.

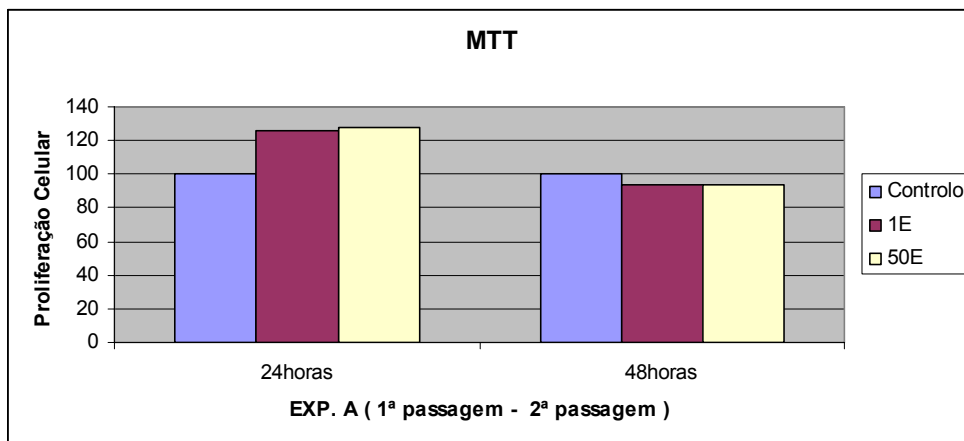


Gráfico 5: Resultados do estudo de proliferação celular realizado com células da série celular MX da 1ª para a 2ª passagem celular, após um período de exposição de 24 e 48 horas, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

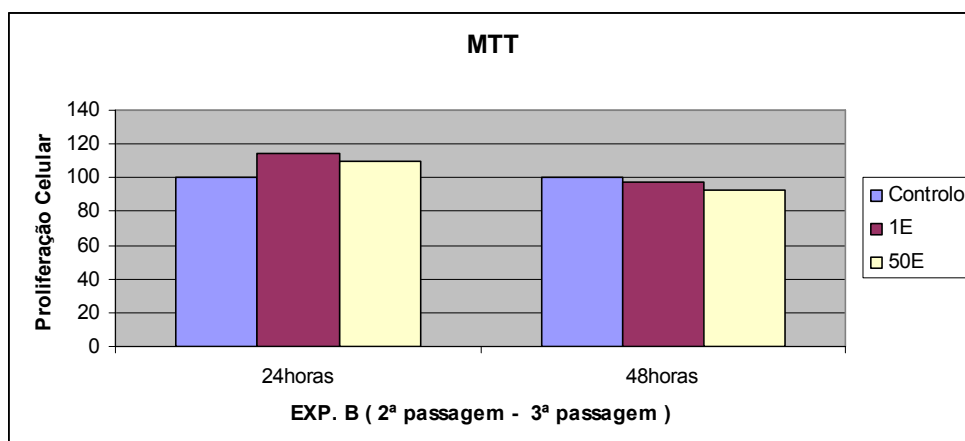


Gráfico 6: Resultados do estudo de proliferação celular realizado com células da série celular MX da 2ª para a 3ª passagem celular, após um período de exposição de 24 e 48 horas, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

4.1.3 ESTRADIOL *VERSUS* NÚMERO DE CÉLULAS

A tabela 8 mostra os resultados obtidos em valores de absorvência do estudo de proliferação celular em duas experiências distintas (EXP.1 e EXP.2), realizadas a partir de um número inicial de células diferente.

TEMPO	CONCENTRAÇÕES (nM) de E ₂		
	Controlo	1E ₂	50E ₂
EXP. 1 (3×10 ⁴ células)	0,149	0,121	0,127
EXP. 2 (6×10 ⁴ células)	0,215	0,247	0,196

Tabela 8: Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT na série celular MX, a partir de um número diferente de células (EXP.1 e EXP.2), após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

A experiência 1 (EXP.1) foi realizada a partir de um número inicial de 3×10^4 células e a experiência 2 (EXP.2), do dobro das células (6×10^4 células). Ambas, foram submetidas às concentrações 1 e 50nM de estradiol, durante 24 horas.

Através da análise do gráfico 7, observamos que, na experiência 1, ocorreu um aumento da proliferação celular, após 24 horas de incubação, com 1 e 50nM de estradiol. Na experiência 2, observou-se um aumento na proliferação celular, na presença de 1nM de estradiol, e uma diminuição na proliferação, após 24 horas de incubação, com 50nM de estradiol.

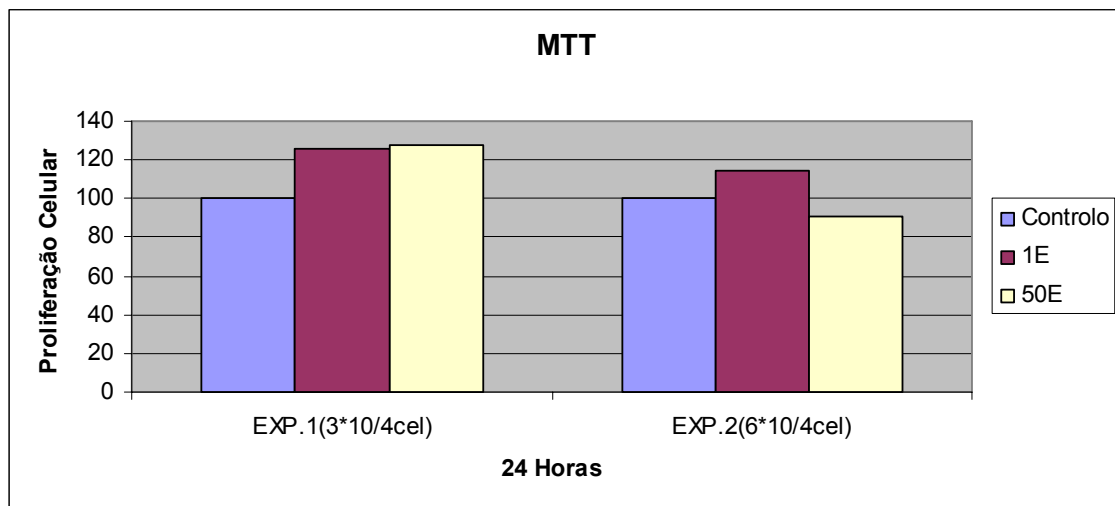


Gráfico 7: Resultados das experiências 1 e 2 (EXP.1 e EXP.2), na série celular do indivíduo MX, após 24 horas de incubação, com diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS EM 4.1

As tabelas 2 e 4 são referentes aos resultados obtidos no estudo de proliferação celular com células de fibroblastos de gengiva humana, utilizando diferentes concentrações de estradiol, ao longo do tempo. Ao analisarmos os resultados, observámos que o período de exposição de 30 minutos não apresentou interesse laboratorial, porque os valores de absorvência obtidos correspondem à interação inicial entre o reagente utilizado, no método MTT, e o meio onde ocorreu a reacção.

Através, da análise das linhas de tendência apresentadas no gráfico 2 e na tabela 5, verificámos que, nas primeiras 6 horas de exposição ao estradiol, foi evidente um aumento da proliferação celular, para a maioria das concentrações utilizadas. Os resultados das linhas de tendência, correspondentes às primeiras 16 horas (gráfico 1 e tabela 3), não apresentaram variações na proliferação celular, com excepção das concentrações de 60 e 120nM de estradiol. No período de 24 horas de exposição ao estradiol, observou-se um aumento da proliferação celular, enquanto que nas 48 horas de exposição, para a maioria das concentrações utilizadas, foi notória uma diminuição da mesma (gráficos 3 e 4 e tabelas 6 e 7). Optámos por estudar, nos ensaios seguintes, os períodos de 24 e 48 horas de exposição e as concentrações de 1 e 50nM de estradiol.

Ao analisarmos o estudo da resposta de diferentes concentrações de estradiol em passagens celulares diferentes (gráficos 5 e 6), observámos uma consistência nos resultados obtidos, independentemente da passagem em que a experiência foi realizada. Desta forma, definimos que poderíamos trabalhar com células da segunda para a terceira passagem, para avaliarmos o efeito inter individual do estradiol nos fibroblastos de gengiva humana, o que está de acordo com outros estudos já publicados (Angelo, 2005; LuDan Qu *et al.*, 2005).

Constatamos, ao realizar o estudo apresentado na tabela 8 e no gráfico 7 que ao realizarmos ensaios de proliferação celular, estes têm de ser efectuados a partir de um número mínimo de 3×10^4 células.

4.3 EFEITO INTER INDIVIDUAL DO ESTRADIOL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA

Estudámos o efeito de duas concentrações de estradiol (1 e 50nM), em três séries de células de fibroblastos de gengiva humana, correspondentes a três indivíduos diferentes, designados de MX, CO e MRS, após um período de exposição de 24 e 48 horas.

4.3.1 SÉRIE CELULAR DO INDIVÍDUO MX

A tabela 9 mostra os resultados obtidos em valores de absorvência do estudo de proliferação celular, pelo método MTT, para a série celular do indivíduo MX.

TEMPO CONCENTRAÇÕES (nM) de E₂

	Controlo	1E ₂	50E ₂
24 Horas	0,065	0,082	0,083
48 Horas	0,096	0,090	0,090

Tabela 9: Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

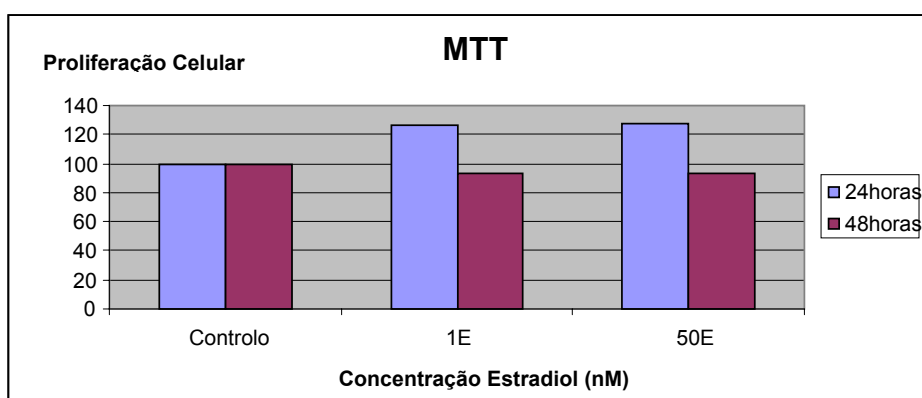


Gráfico 8: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂). Resultados para n=1.

O gráfico 8 apresenta os resultados obtidos para as diferentes concentrações estudadas, comparativamente ao controle. Observou-se, após um período de 24 horas de incubação com estradiol, um aumento da proliferação celular. Contudo, após um período de 48 horas, verificou-se uma diminuição da proliferação celular.

4.3.2 SÉRIE CELULAR DO INDIVÍDUO CO

A tabela 10 mostra os resultados obtidos em valores de absorvência do estudo de proliferação celular, pelo método MTT, para a série celular do indivíduo CO.

TEMPO CONCENTRAÇÕES (nM) de E₂

	Controlo	1E₂	50E₂
24 Horas	0,012	0,053	0,056
	0,012	0,040	0,051
48 Horas	0,027	0,035	0,046
	0,049	0,034	0,054

Tabela 10: Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

Ao analisar o gráfico 9, observámos que a incubação com 1nM de estradiol provocou, após 24 horas de exposição, um aumento significativo ($P \leq 0,034$) da proliferação celular em relação ao controlo. Com 50nM de estradiol, também observámos um aumento significativo ($P \leq 0,004$) da proliferação celular, em relação ao controlo. Após 48 horas de incubação, para ambas as situações, a proliferação celular decresceu.

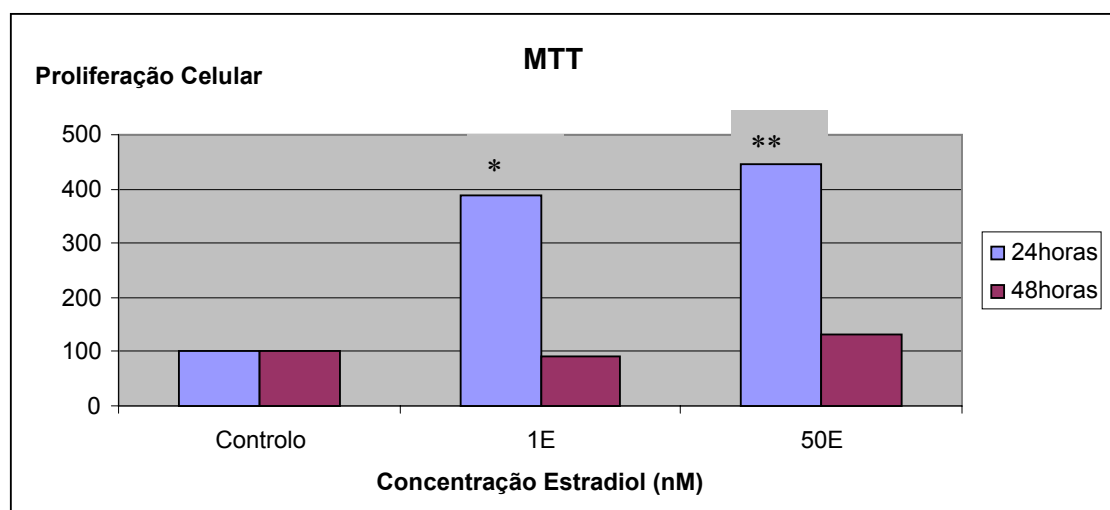


Gráfico 9: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E_2). Os resultados correspondem à média \pm erro padrão para $n=2$. * $P < 0,034$ quando comparado com o controlo e ** $P < 0,004$ quando comparado com o controlo.

Os resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondentes às diferentes concentrações de estradiol e aos períodos de exposição, anteriormente apresentados, para a série celular do indivíduo CO, podem ser observados na figura 8 e na tabela 11.

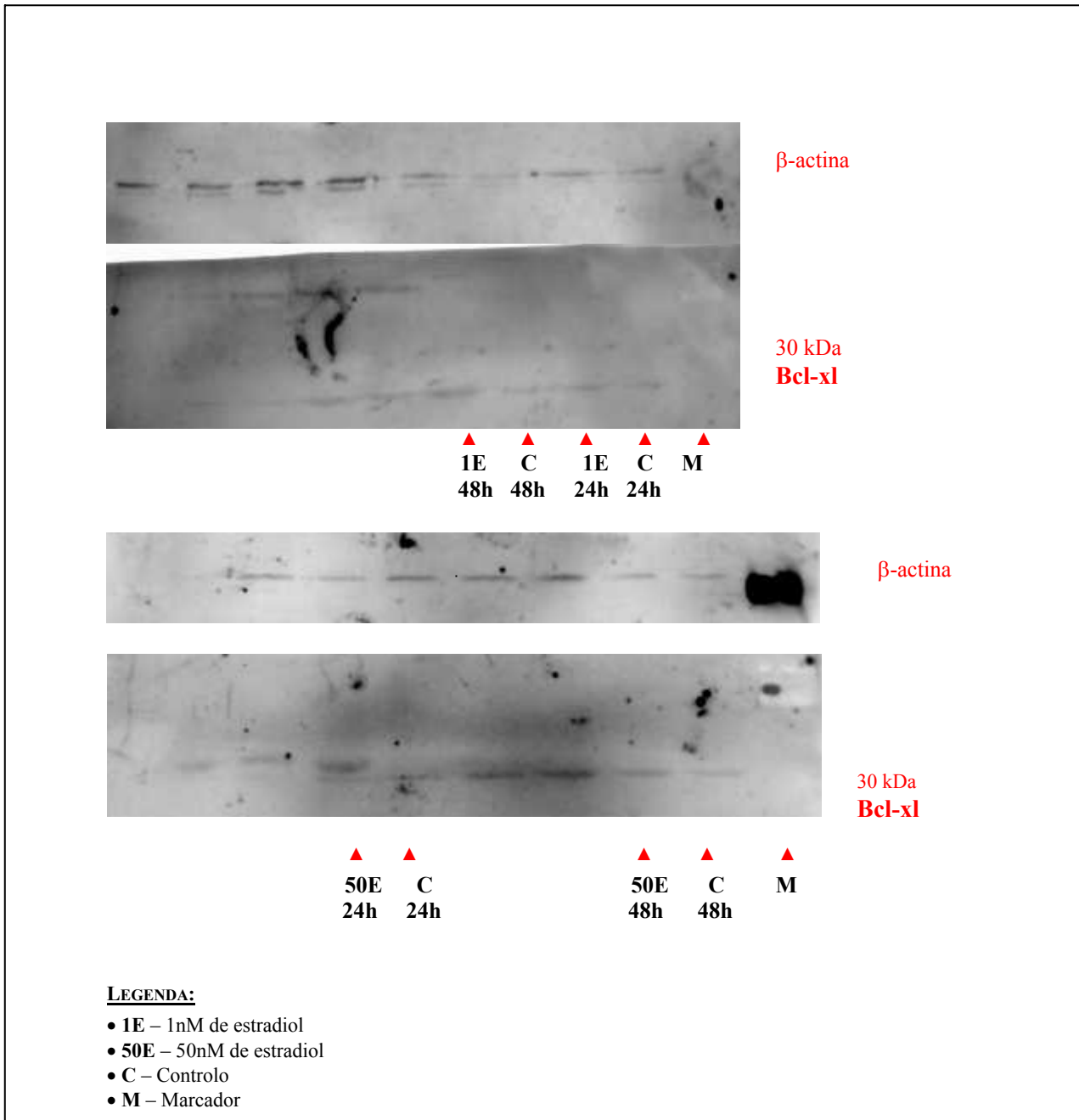


Figura 8: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂).

EXPRESSÃO PROTEÍNA ANTI-APOPTÓTICA BCL-XL

	24 Horas	48 Horas
Controlo	0,879955	1,068121
1E₂	1,163971	1,287127
50E₂	3,333601	1,107410

Tabela 11: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondentes à série celular do indivíduo CO, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECFTM.

Observámos, para as concentrações estudadas, após um período de exposição de 24 e 48 horas, um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, em relação ao controlo (figura 8 e tabela 11). Para o indivíduo em questão, a proteína bcl-xl não se apresenta dimerizada ou seja, não formou com outras proteínas dímeros quantificáveis.

4.3.3 SÉRIE CELULAR DO INDIVÍDUO MRS

A tabela 12 mostra os resultados obtidos em valores de absorvência do estudo de proliferação celular, pelo método MTT, para a série celular do indivíduo MRS.

TEMPO CONCENTRAÇÕES (nM) de E₂

	Controlo	50E ₂	200E ₂	400E ₂
48 Horas	0,043	0,034	0,014	0,014

Tabela 12: Resultados das absorvências obtidas pelo método MTT, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200 nM e 400nM) de estradiol (E₂).

Nesta série celular, o estradiol provocou, com 48 horas de incubação, uma diminuição da proliferação celular. Ao aumentarmos a concentração de estradiol, o número de células diminuiu, evidenciando o possível efeito tóxico do estradiol.

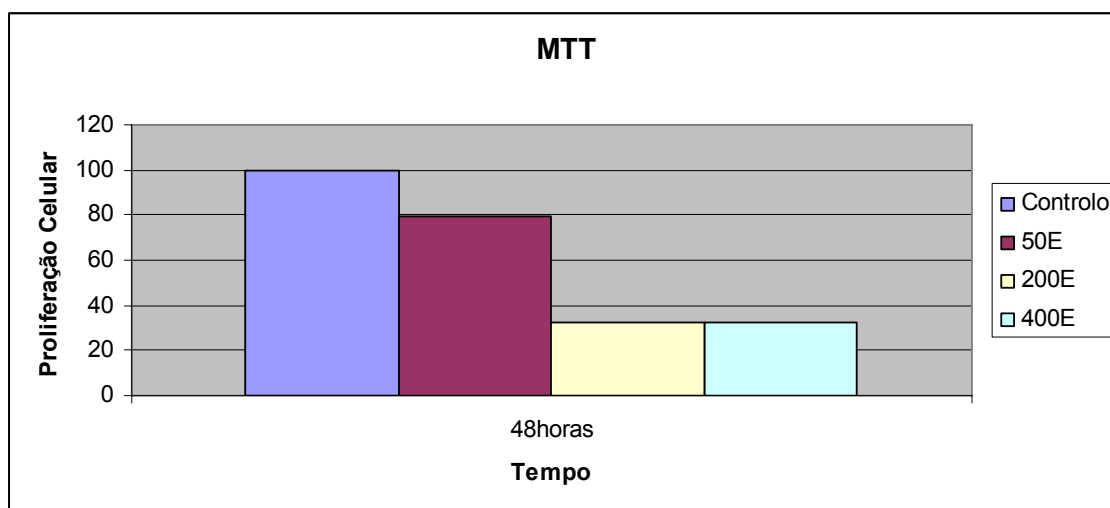


Gráfico 10: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E₂). Resultados para n=1.

A expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondente às diferentes concentrações de estradiol e aos períodos de exposição anteriormente apresentados, na série celular do indivíduo MRS, pode ser observada na figura 9 e nas tabelas 13 e 14.

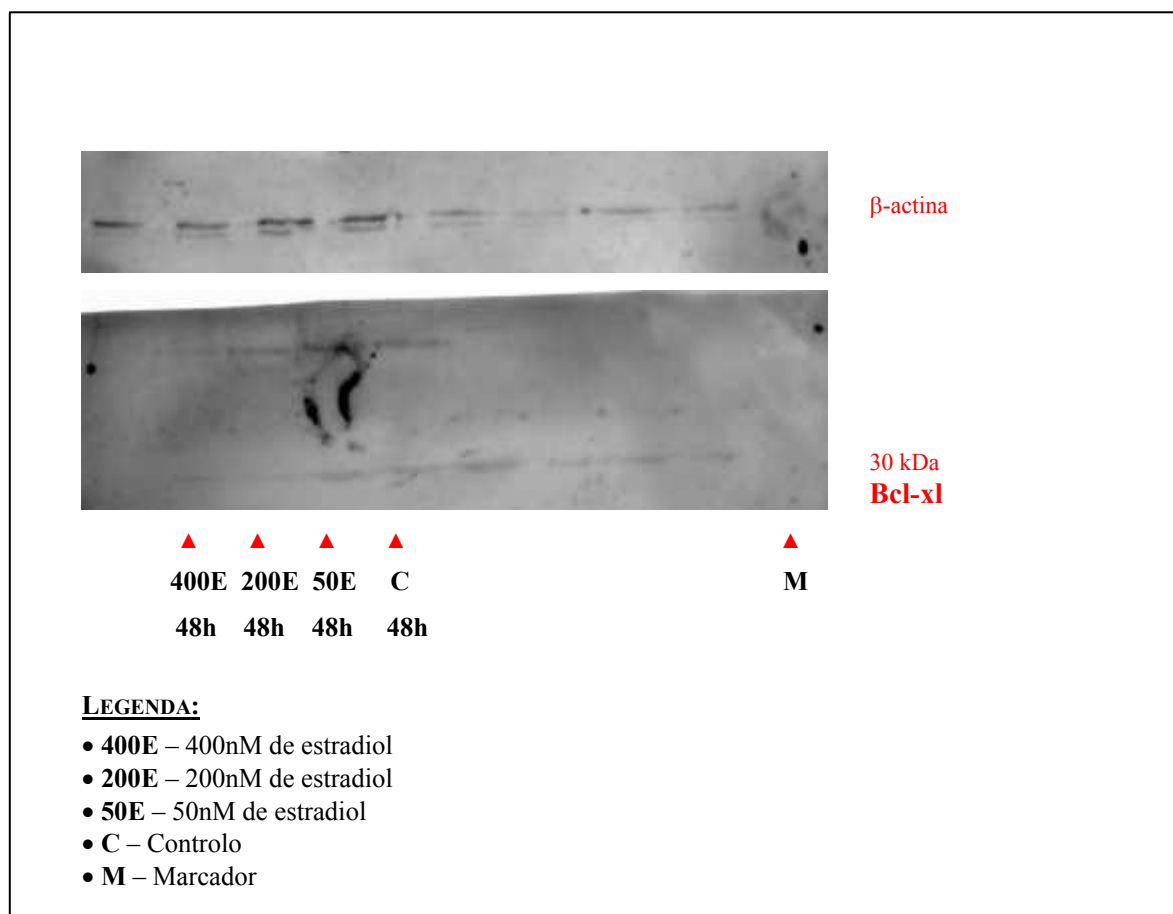


Figura 9: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E₂).

EXPRESSÃO PROTEÍNA ANTI-APOPTÓTICA BCL-XL

48 Horas	
Controlo	0,7126937
50E₂	1,0563012
200E₂	0,7260056
400E₂	1,0153346

Tabela 13: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondentes à série celular do indivíduo MRS, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECF™.

**EXPRESSÃO DA DIMERIZAÇÃO
DA PROTEÍNA ANTI-APOPTÓTICA BCL-XL**

48 Horas	
Controlo	69,70841
50E₂	65,30799
200E₂	62,65238
400E₂	45,06600

Tabela 14: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl dimerizada, correspondentes à série celular do indivíduo MRS, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECF™.

Observámos, para as concentrações estudadas, após um período de exposição de 48 horas, um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl (figura 9 e tabela 13). Para o indivíduo em questão a proteína bcl-xl apresentou-se sob a forma dimerizada ou seja, formou com outras proteínas dímeros quantificáveis (tabela 14).

4.4 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS EM 4.3

O gráfico 11 apresenta os resultados do estudo da proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana, dos indivíduos MX e CO, das 24 para as 48 horas, após exposição a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol. Observámos uma diminuição da proliferação celular, das 24 para as 48 horas, em ambos os indivíduos, que poderá estar relacionada com o efeito tóxico do estradiol, nas células de fibroblastos de gengiva humana estudadas.

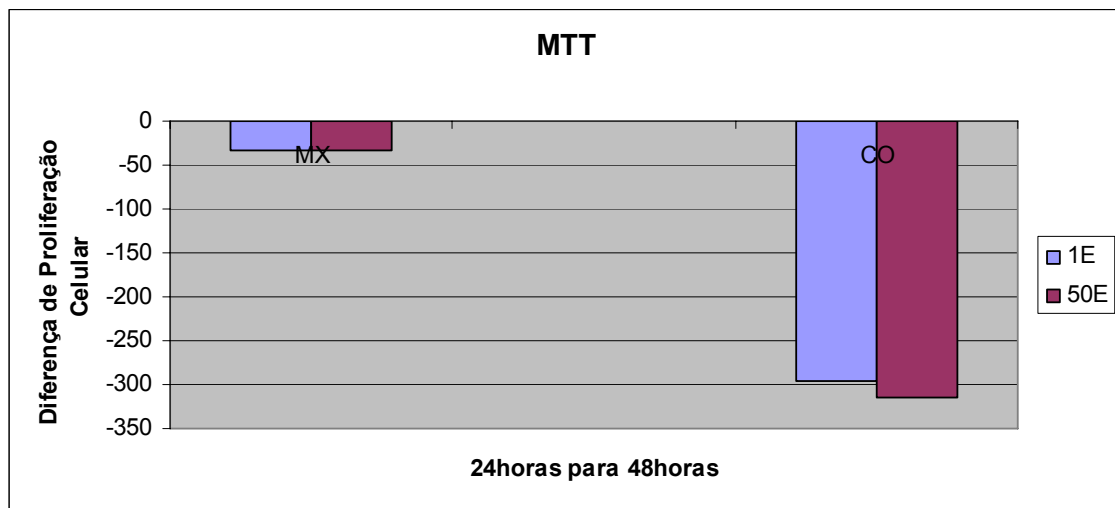


Gráfico 11: Resultados da diferença do estudo de proliferação celular, da série correspondentes aos indivíduos MX e CO, das 24 para as 48 horas de exposição, com as concentrações de 1nM e 50nM de estradiol (E₂).

Verificámos, através da análise do gráfico 11, que a diminuição da proliferação celular, das 24 para as 48 horas, foi mais evidente na série celular do indivíduo CO. Simultaneamente, o gráfico 12 revela diferentes respostas na proliferação celular, para a mesma concentração e período de exposição ao estradiol, nas séries celulares em questão. As diferenças proliferativas podem estar relacionadas com o efeito inter individual da acção do estradiol, nas células de fibroblastos de gengiva humana.

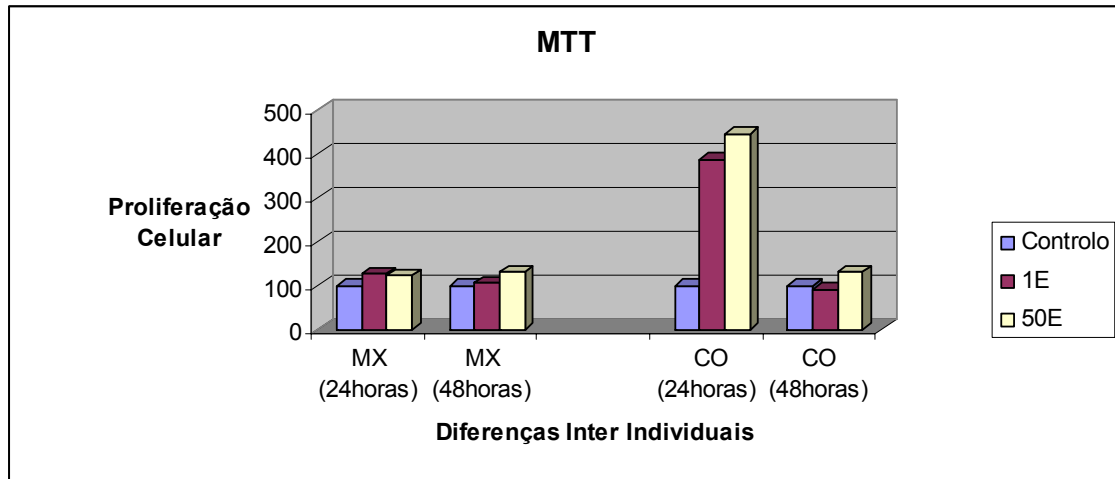


Gráfico 12: Resultados da proliferação celular, em diferentes séries celulares (MX e CO), após 24 e 48 horas de exposição, com diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E_2).

Relativamente à expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, observámos, no indivíduo CO, um aumento da sua expressão, das 24 para as 48 horas na presença de 1nM de estradiol e uma diminuição da sua expressão para a concentração de 50nM de estradiol. No indivíduo MRS verificámos, após 48 horas de exposição ao estradiol, um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, independentemente da concentração utilizada. No indivíduo CO, a expressão da proteína bcl-xl não foi acompanhada por um mecanismo de dimerização, contrariamente ao que se verificou no indivíduo MRS (quadro 2). Isto indica que no indivíduo CO, das 24 para as 48 horas, em que a diminuição da proliferação celular foi acentuada, ocorreu expressão da proteína bcl-xl sem dimerização, poderá estar a ocorrer apoptose. No indivíduo MRS, como se observou um aumento da expressão da proteína bcl-xl, acompanhada de dimerização, a apoptose poderá não ocorrer, pois esta proteína inibe a apoptose ao bloquear, a actividade das proteínas pró-apoptóticas no domínio BH3 (Benjamin *et al.*, 2002; Manabu *et al.*, 2005). O facto das séries celulares dos indivíduos CO e MRS apresentarem diferentes respostas em relação ao processo apoptótico poderá ser indicativo de uma acção individual de resposta ao estradiol.

	PROLIFERAÇÃO CELULAR	EXPRESSION DA PROTEÍNA BCL-XL		DIMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA BCL-XL	OCORRÊNCIA DE APOPTOSE
		1nM E ₂	50nM E ₂		
INDIVÍDUO CO (24 HORAS → 48 HORAS)	↓↓	↑	↓	NÃO	SIM
INDIVÍDUO MRS (48 HORAS)	↓	↑		SIM	NÃO

Quadro 2: Resultados da proliferação celular e expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl na, série celular dos indivíduos CO e MRS.

4.5 EFEITO GENÓMICO DO ESTRADIOL EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA

De forma a certificarmos-nos que a acção exercida pelo estradiol, nas células de fibroblastos de gengiva humana, foi devida a um mecanismo de acção genómica, estudámos, nos mesmos períodos e nas mesmas concentrações, a acção do estradiol e a acção do estradiol associado à albumina sérica bovina (estradiol-bsa).

A tabela 15 mostra os resultados obtidos, em valores de absorvência, do estudo de proliferação celular, pelo método MTT, para a série celular do indivíduo MX e CO.

SÉRIE CELULAR	TEMPO	CONCENTRAÇÕES (nM) de E ₂ / Ebsa				
		Controlo	1E ₂	1Ebsa	50E ₂	50Ebsa
MX	24 Horas	0,072	0,090	0,083	0,093	0,068
		0,068	0,088	0,084	0,079	0,073
	48 Horas	0,069	0,087	0,066	0,104	0,065
		0,080	0,071	0,068	0,093	0,078
CO	24 Horas	0,012	0,053	0,011	0,056	0,026
		0,012	0,040	0,017	0,051	0,020
	48 Horas	0,027	0,035	0,040	0,046	0,008
		0,049	0,034	0,021	0,054	0,009

Tabela 15: Resultados das absorvências obtidas, pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana dos indivíduos MX e CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa).

Verificámos, através da análise do gráfico 13, que na série celular MX, a presença de 1 e 50nM de estradiol teve uma acção mais evidente na proliferação celular, quando comparadas com as mesmas concentrações de estradiol-bsa.

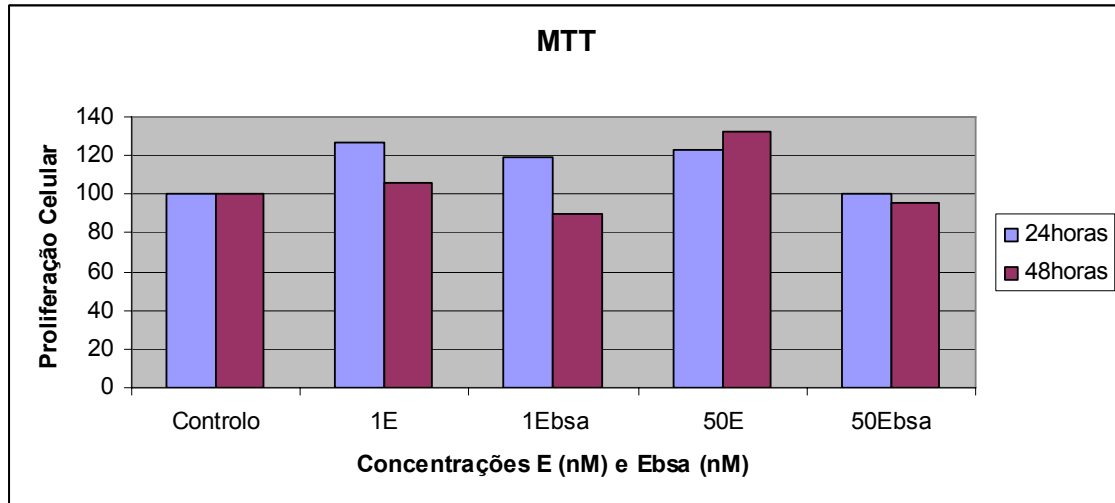


Gráfico 13: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa). Os resultados correspondem à média ± erro padrão para n=2.

No gráfico 14 pudemos observar o resultado da acção genómica do estradiol, na série celular de um outro indivíduo, designado de CO. As concentrações de 1 e 50nM de estradiol provocaram um aumento significativo na proliferação celular, após um período de incubação de 24 horas. Após 48 horas de incubação, para ambas as situações, a proliferação celular decresceu. Para as mesmas concentrações e períodos de exposição, a presença de estradiol-bsa não provocou um aumento significativo da proliferação celular.

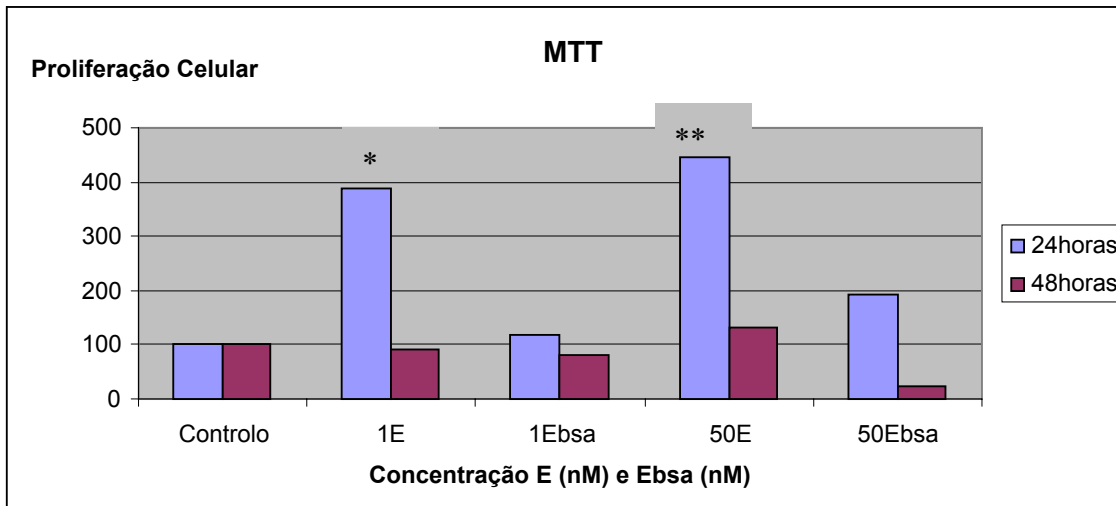


Gráfico 14: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo CO, após um período de 24 e 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E_2) e estradiol-bsa (Ebsa). Os resultados correspondem à média \pm erro padrão para $n=2$. * $P < 0,034$ quando comparado com o controlo e ** $P < 0,004$ quando comparado com o controlo.

Estudámos, também, na série celular de um outro indivíduo, designado de MRS, a acção genómica do estradiol. A tabela 16 mostra os resultados obtidos, em valores de absorvência do estudo de proliferação celular.

TEMPO	CONCENTRAÇÕES (nM) de E_2 /Ebsa						
	Controlo	50 E_2	50Ebsa	200 E_2	200Ebsa	400 E_2	400Ebsa
48 Horas	0,043	0,034	0,038	0,014	0,040	0,014	0,046

Tabela 16: Resultados das absorvências, obtidas pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E_2) e estradiol-bsa (Ebsa).

Observámos no gráfico 15 que o efeito isolado do estradiol, para as diferentes concentrações (50, 200 e 400nM) provocou uma diminuição da proliferação celular. Contudo, para as mesmas concentrações de estradiol-bsa, não se observou uma diminuição na proliferação celular, pois os resultados são muito próximos dos obtidos para o controlo.

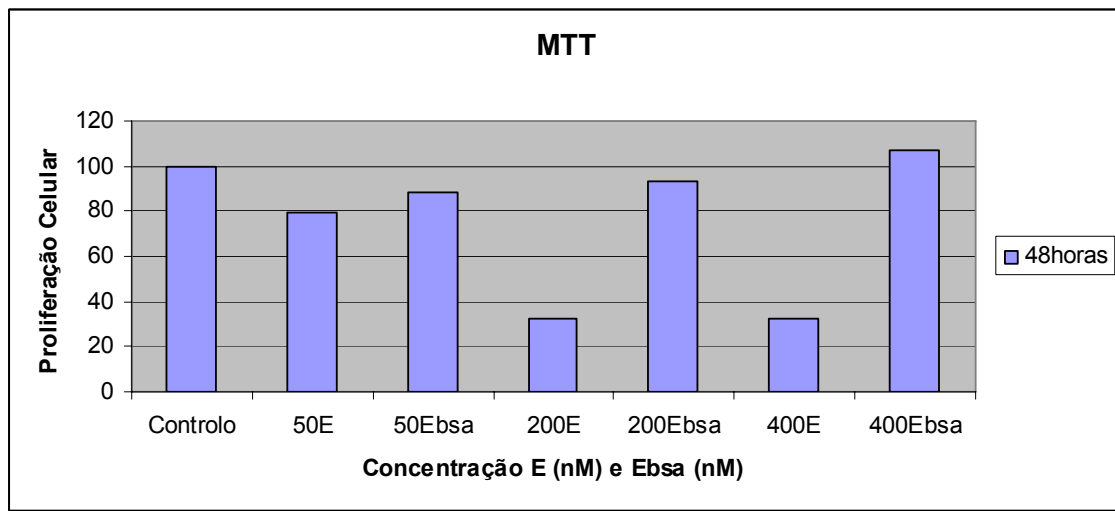


Gráfico 15: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MRS, após um período de 48 horas de exposição, a diferentes concentrações (50nM, 200nM e 400nM) de estradiol (E₂) e estradiol-bsa (Ebsa).

Após a análise dos gráficos anteriormente apresentados (gráficos 13, 14 e 15), observámos que o efeito tóxico do estradiol está relacionado com a sua acção genómica. Ou seja, o estradiol, depois de atravessar a membrana celular, exerce as suas acções biológicas, por meio de ligação a receptores nucleares específicos, os receptores de estrogénio (Jan *et al.*, 2004). Quando ligado à albumina, não consegue entrar na célula para exercer os seus efeitos e, consequentemente, não se verificaram alterações na proliferação celular, tal como foi demonstrado em outros estudos (Panayiotis *et al.*, 1999).

4.6 EFEITO DO RESVERATROL EM CÉLULAS FIBROBLASTOS DE GENGIVA HUMANA

Estudámos a proliferação celular na presença de estradiol e resveratrol, após um período de exposição de 24 horas.

A tabela 17 mostra os resultados obtidos, em valores de absorvência pelo método MTT, para a série celular MX, com 1 e 50nM de estradiol e das mesmas concentrações na presença de 8mg/ml de resveratrol.

TEMPO CONCENTRAÇÕES (nM) de E₂

	Controlo	1E ₂	50E ₂	1E ₂ + 8R	50E ₂ + 8R
24 Horas	0,123	0,247	0,196	0,258	0,253

Tabela 17: Resultados das absorvências, obtidas pelo método MTT na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e 8mg/ml de resveratrol (R).

Ao observar o gráfico 16, verificámos que a presença de resveratrol aumentou, para as concentrações estudadas, a proliferação celular.

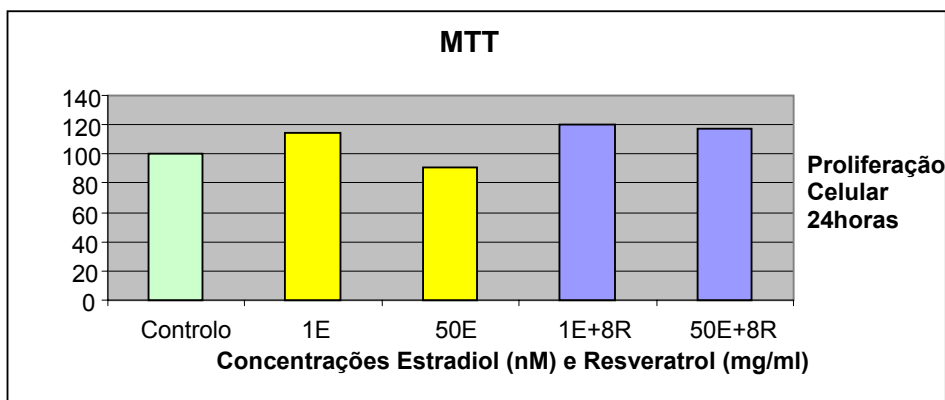


Gráfico 16: Resultados do estudo de proliferação celular, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição, a diferentes concentrações (1nM e 50nM) de estradiol (E₂) e 8mg/ml de resveratrol (R). Resultados para n=1.

A expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, correspondente à concentração de 1nM estradiol e, da mesma concentração de estradiol, na presença de 8mg/ml de resveratrol, pode ser observada na figura 10 e na tabela 18.

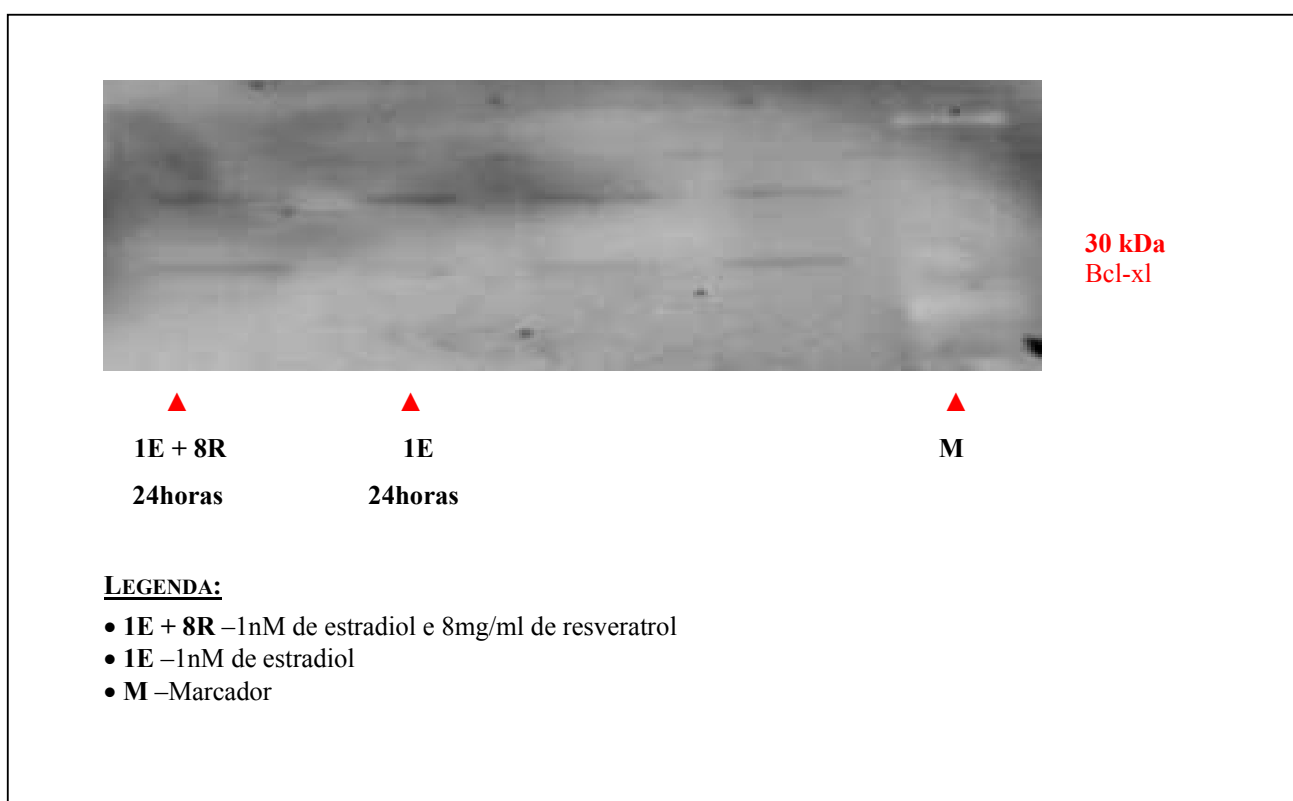


Figura 10: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl, na série celular de fibroblastos de gengiva humana do indivíduo MX, após um período de 24 horas de exposição a 1nM de estradiol (E₂) e 8mg/ml de resveratrol (R).

CONCENTRAÇÃO de E ₂ /R TEMPO	FLUORESCÊNCIA DA BANDA DA PROTEINA BCL-xl
1E ₂ 24 Horas	3390.357
1E ₂ + 8R 24 Horas	7476.830

CONCENTRAÇÃO de E ₂ /R TEMPO	FLUORESCÊNCIA DA BANDA DA PROTEINA DIMERIZADA PELA PROTEINA BCL-xl
1E ₂ 24 Horas	6032.677
1E ₂ + 8R 24 Horas	6677.035

Tabela 18: Resultados da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xl e da sua dimerização, correspondentes à série celular do indivíduo MX, obtidos através da detecção de fluorescência no sistema ECFTM

Após análise da tabela 18 e da figura 10 observámos que a presença de 1nM de estradiol às 24 horas de exposição é um indicador de baixos níveis de apoptose pois, a proteína apresenta-se dimerizada. Na presença de resveratrol, ocorreu maior expressão de proteína bcl-xl, acompanhada de dimerização. Isto pode indicar menos morte celular programada, o que pode não ser bom para proteger a célula dos efeitos tóxicos. Assim sendo, o resveratrol parece não apresentar um efeito protector, mas sim um efeito potenciador do efeito tóxico do estradiol.

Os resultados obtidos parecem contrariar outros estudos, os quais referem que o resveratrol exerce os seus efeitos benéficos, através da sua actividade antioxidante e antimutagénica (Frémont, 2000; Schneider *et al.*, 2000; Oak *et al.*, 2005). Vários estudos (Benitez *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2007, Sharmila *et al.*, 2007) referem que o resveratrol induz o processo de apoptose, situação que não se observou no nosso estudo.

Simultaneamente, os resultados obtidos no método MTT, também, contrariam estudos que evidenciaram o papel protector dos flavonóides na protecção das células contra a citotoxicidade (Alia *et al.*, 2005), através de mecanismos de inibição da proliferação celular (Dorai e Aggarwal, 2004; Sharmila *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÃO

- ✓ Observámos, no nosso estudo, diferentes respostas inter individuais da citotoxicidade do estradiol.

- ✓ Constatámos que os fibroblastos de gengiva humana parecem ser um modelo de estudo viável para estudos genéticos inter individuais de resposta aos estrogénios, de forma a poderem ser aplicados no estudo individual de risco e ajuste terapêutico em candidatas à terapia hormonal de substituição.

- ✓ Observámos, no nosso estudo, que o resveratrol parece não apresentar um efeito celular protector.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram estudados poucos indivíduos, pelo que terá interesse alargar a amostra populacional, de forma a testar um maior número de indivíduos nas mesmas condições experimentais.

Torna-se também importante completar o estudo com a análise do genótipo de cada indivíduo e análise da expressão de outras proteínas, envolvidas no processo de apoptose.

Seria interessante aplicar e comparar os resultados deste trabalho com um outro realizado em amostras de pele dos mesmos indivíduos, para observar ou não possíveis diferenças.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aherne SA, O'Brien N. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **18**, 75-81.

Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. 2005. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, **558**, 1-10.

Angelo J Mariotti. 2005. Estrogen and Extracellular matrix influence human gingival fibroblast proliferation and protein production. *J. Periodontol*, **76**, 1391-1397.

Arkadiusz S, Katarzyna J, Jozef H, Pioth L, Jerzy P, Slawomir W. 2003. Differential effects of estradiol and raloxifene on collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblast. *International Journal of Molecular Medicine*, **12**, 803-809.

Azevedo C. 1999. *Biologia Celular e Molecular. 1.ª Edição Técnica. Lisboa, Porto e Coimbra.*

Aznárez M. 2003. Role of hormone replacement therapy in the prevention and treatment of menopausal osteoporosis. *Na Sist Sanit Navar*, **26** (3), 99-105.

Banks E, Reeves G, Beral V. 2004. Impact of use of hormone replacement therapy on false positive recall in the NHS breast screening programme: results from the Million Women Study. *BMJ*, **328**, 1291-92.

Barbara De Servi, Alexander H, Senad M, Doris M. 2005. Impacto of PKC on estrogen receptor localization and activity in breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 4946-4955.

Benitez DA, Pozo G, Clementi M, Castellón E, Fernandez Salguero PM. 2007. Non-genomic action of resveratrol on androgen and oestrogen receptors in prostate cancer: modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Br. J. Cancer*, **96** (10), 1595-604.

Benjamin E, Brian LC, Scott RM, Robert AN, Ellen ML, Ivana R, Laura AK, Xiaoyun F, Justin SW, Jay WH, Kevin AR, Steven JW. 2002. Bcl-x1 deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell*, **111**, 51-62.

Beral V, Banks E, Reeves G. 2002. Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet*, **360**, 942-44.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **90**, 157– 177.

Blom MJ, Wassink MG, Kloosterboer HJ, Ederveen AG, Lambert JD, Goos H. 2001. Metabolism of estradiol, ethynilestradiol, and moxestrol in rat uterus, vagina, and aorta: influence of sex steroid treatment. *Drug Metabolism and Disposition. Lancet*, **29** (1), 76-81.

Blumel J, Araya H, Riquelme R, Castro G, Sánchez F, Gramegna G. 2002. Prevalência de los trastornos de la sexualidade en mujeres climatéricas. Influencia de la menopausia y de la terapia de reemplazo hormonal. *Rev. Méd. Chile*, **130**, 1131-8.

Borner C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol*, **39**, 615-47.

Bradamante S, Barrenghi L, Villa A. 2004. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*, **22**, 169-88.

- Brincat M, Baron Y, Galea R. 2005. Estrogens and the skin. *Climacteric*, **8**, 110-123.
- Brown J, Vittinghoff E, Kanaya A. 2001. Urinary tract infections in postmenopausal women: effect of hormone therapy and risk factors. *Obstet Gynecol*, **98**, 1045-1049.
- Brumel J, Castelo –Branco, Binfa L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B. 2000. Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas*, **34**, 17-23.
- Brumel J, Castelo- Branco, Kerrigan N, Cancelo M, Brumel B, Haya J. 2003. Influences of hormone replacement therapy on postmenopausal women's health perceptions. *Menopause. Maturistas*, **10**, 335-40.
- Cain, K, Bratton, SB, Cohen GM. 2002. The Apaf-1 Apoptosome: a Large Caspase-Activating Complex. *Biochimie*, **84**, 203-214.
- Cande, C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. 2002. Apoptosis-Inducing Factor (AIF): a Novel Caspase-Independent Death Effector Released From Mitochondria. *Biochimie*, **84**, 215-222.
- Cano A, Tarin JJ, Duenas JL. 2002. Two years prospective, randomized, trial comparing an innovative Twice-a-week progestin regimen with a continuous combined regimen as postmenopausal hormone therapy. *Fertil Steril*, **71**, 129-136.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. 2000. Triggering and Modulation of Apoptosis by Oxidative Stress, FreeRadic. *Biol. Med*, **29**, 323-333.
- David B, Wolfgang S, Roman L, Inge T, Reinhard K, Adam C. 2003. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM- C7H2 lymphocytic leukaemia cells. *Cancer Letters*, **195**, 193-199.

-
- Dorai T, Aggarwal BB. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer letters*, **215**, 129-140.
- Eguchi H, Suga K, Sagi H, Toi M, Nakachi K, Hayashi S. 2000. Different expression patterns of Bcl-2 family genes in breast cancer by estrogen receptor status with special reference to pro-apoptotic bak gene. *Cell Death and Differentiation*, **7**, 439-446.
- Ferguson LR. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.
- Ferri, KF, Kroemer G. 2001. Organelle-Specific Initiation of Cell Death Pathways. *Nat. Cell Biol*, **3**, 255-263.
- Formica J, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicology*, **33** (2), 1061-1080.
- Frémont L. 2000. Minireview: Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, **66** (8), 663-673.
- Galati G, O'Brien PJ. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine*, **37** (3), 287-303.
- Genazzani AR, Nicolucci A, Campagnoli C, Crosignani P, Nappi C, Serra GB. 2002. Assessment of the QoI in Italian menopausal women: comparison between HRT users and non-users. *Maturitas*, **42**, 267-80.

Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. 2000. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern. Med*, **133**, 933-41.

Gruber CJ, Tschugguel W, Scheneberger C, Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine*, **346** (5), 340-352.

Gruber DM, Huber JC. 2001. Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy. *Maturitas*, **37**, 151-157.

Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. 2001. Selective Growth-Inhibitory, Cell-Cycle Deregulatory and Apoptotic Response of Apigenin in Normal versus Human Prostate Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **287**, 914-920

Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, **96**, 67-202.

Henrikson. 1997. *Histology. 3 edition. Lippincott Williams & Wilkins.*

Hertog M, Hollman P, Katan M, Kromhout D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition Cancer*, **20** (1), 21-29.

Hickey M, Davis SR, Sturdee DW. 2005. Treatment of menopausal symptoms: what shall we do now? *Lancet*, **366**, 409-21.

Hwang JT, Kwak DW, Lin SK, Kim HM, Kim YM, Park J. 2007. Resveratrol induces apoptosis in chemoresistant cancer cells via modulation of AMPK signalling pathway. *Ann N Y Acad. Sci*, **1095**, 441-8.

Jan JB, Jennifer T, Rana V, Eric WFL. 2004. Steroid receptor action. *Best Practice & Research*, **18**, 265-283.

Jason O`Neill, Manion M, Schwartz P, Hockenbery DM. 2004. Promises and challenges of targeting bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy. *Biochimic et Biophysica*, **1705**, 43-51.

Jennifer M, Zeng, Xiao-Rong, Boise L. 2000. Regulation of bcl-xl: a little bit of this and little bit of start. *Onology*, **12**, 543-549.

Jennifer RD, Margaret AL, Vida MSM, Dean PE, Ann MN. 2002. Differential Modulation of DNA Conformation by Estrogen Receptors α and β . *J. Biol. Chem*, **277** (10), 8702-8707.

Jozef H, Rafal T, Katarzyna J, Slawomir W, Denis AM, Krzysztoł JC, Maria Z, Jerzy J, Artur J. 2004. Differential effects of estradiol, raloxifene and tamoxifen on estrogen receptor expression in cultured human skin fibroblast. *International Journal of Molecular Medicine*, **13**, 903-908.

Junqueira. 1995. *Histologia Básica. 8ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.*

Konrad F, Luisa A, Lars-Arne H, Margaret W, Jan-Ake G. 2005. Reflections on the Discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocrine Reviews*, **26** (3), 465-478.

- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr*, **38**, 133–142.
- Kuo SM, Morehouse HF, Lin CP. 1997. Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Letters*, **116**, 131-137.
- Labrie F, Luu TV, Lin SX, Simard J, Labrie C. 2000. Role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 421-427.
- Laura G, Pier C, Massimo L, António G. 2006. Epigenetic Information and Estrogen Receptor Alpha Expression in Breast Cancer. *The Oncologist*, **11**, 1-8.
- Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT. 2003. Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*, **144**, 3382-3398.
- Lee AJ, Kosh JW, Conney AH, Zhu BT. 2001. Characterization of the NADPH-dependent metabolism of 17 β -estradiol to multiple metabolites by human liver microsomes and selectively expressed human cytochrome P450 3 A4 and 3 A5. *J. Pharmacol*, **298**, 420-432.
- Lee AJ, Mills LH, Kosh JW, Conney AH, Zhu BT. 2002. NADPH-dependent metabolism of estrone by human liver microsomes. *J. Pharmacol*, **300**, 838-849.
- Leist M, Jaattela M. 2001. Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol*, **8**, 589-598.

- Liehr JG. 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews*, **21**, 40-54.
- Lopaczynski W, Zeisel SH. 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*, **21**, 295-307.
- LuDan Qu, Masatoshi A, Yoko Y, Osamu I. 2006. Effects of 17 β -estradiol on matrix metalloproteinase-1 synthesis by human dermal fibroblast. *Maturitas*, **54**, 39-46.
- Ma X, Tian X, Huang X, Yan F, Quião D. 2007. Resveratrol induced mitochondrial dysfunction and apoptosis are associated with ca (2+) and mClCR mediated MPT activation in HepG2 cells. *Mol. Cell Biochem*.
- Manabu E, Ryungsa K, Kazuak T, Yoko V, Tetsuya T. 2005. Targeted therapy against Bcl-2-related protein in breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, **7**, 940-952.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*, **426**, 331-336.
- Meinhardt U, Mullis PE. 2002. The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. *Hormone Research*, **57** (5-6), 145-152.
- Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C. 2002. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J. Clin Endocrinol Metab*, **87**, 5760-5768.
- Misso M, Jang C. 2005. Differential expression of factors involved in fat metabolism with age and the menopause transition. *Maturitas*, **51**: 299-306.

Mitrunen K, Hirvonen A. 2003. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research*, **544**, 9-41.

Mosekilde L, Beck-Nielsen H, Sorensen OH. 2002. Hormonal replacement therapy reduces forearm fracture incidence in recent postmenopausal women – results of the Danish Osteoporosis Prevention Study. *Maturitas*, **42** (1), 59-71.

Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ. 2002. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis. *International Journal of Cancer*, **98**, 761-769.

Naftolin F, Schneider H, Sturdee D. 2004. Guidelines for the hormone treatment of Women in the menopausal transition and beyond: position statement by the executive committee of the International Menopause Society. *Climacteric*, **7**, 333-37.

Nelson LR, Bulun SE. 2001. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol*, **45**, 116-124.

O’Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O’Brien M, Williamson G. 2003. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*, **65**, 479-491.

Oak MH, El Bedoui J, Schini-kerth VB. 2005. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**, 1-8.

Panayiotis ES, Darlene CD, Lorraine S, Larry MM, Donald EF. 1999. Differential Effects of Estradiol and Estradiol-BSA Conjugates. *Endocrinology*, **11**, 5455-5458.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*, **63**, 1035-1042.

Ramos S, Alía M, Bravo L, Goya L. 2005. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Agricultural and food chemistry*, **53**, 1271-1280.

Rico E, Cruz J. 2002. Infección urinária en el embarazo y menopausia. *Arch. Esp. Urol*, **55**, 1165-1179.

Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, Philip Tate. 1997. Anatomia e fisiologia. 1.^a Edição. *Lisboa*.

Ross J, Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev. Nutr*, **22**, 19-34.

Ryungsa Kim. 2005. Unknotting the roles of bcl-2 and bcl-xl in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **333**, 336-343.

Schneider Y, Vicent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, Seiler N, Raul F. 2000. Anti-proliferative effects of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Letters*, **15**, 85-91.

Sharmila S, Gyanendra S, Rakesh KS. 2007. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Bioscience*, **12**, 4839-4854.

Siiteri PK. 1987. Adipose tissue as a source of hormones. *Am. J. Clin. Nutr*, **45**, 277-282.

Simpson ER, Davis SR. 2001. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis – Some New Perspectives. *Endocrinology*, **142**, 4589-4594.

Simpson ER, Misso M, Hewitt KN. 2004. Estrogen-the Good, The Bad, and the Unexpected. *Endocrine Reviews*, **26** (3), 322-330.

Slee, EA, Adrain C, Martin SJ. 1999. Serial Killers: Ordering Caspase Activation Events in Apoptosis. *Cell Death*, **11**, 1067-1074.

Son Y, Lee KY, Lee JC, Jang HS, Kim JG, Jeon YM. 2005. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicology Letters*, **155**, 115–125.

Stefan N, Sari M, Eckardt T, Michel T, Jane T, Goran A, Eva E, Katarina P, Margaret W, Jan-Ake G. 2001. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, **81**, 1535-1565.

Stevenson JC, Teter P, Lees B. 2001. 17 β -estradiol (1mg/day) continuously combined with dydrogesterone (5,10 or 20mg/day) increases bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas*, **38**, 665-672.

Stevenson JC. 2005. Justification for the use of HRT in the long-term prevention of osteoporosis. *Maturitas*, **51**, 113-126.

Thresia T, Michael G. 2004. Estrogen Receptores as Targets for Drug Development for Breast Cancer, Osteoporosis and Cardiovascular Diseases. *Current Cancer Drug Targets*, **4**, 483-499.

- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters*, **227**, 115-124.
- Tyagi A, Bhatia N, Condon MS, Bosland MC, Agarwal C, Agarwalr. 2002. Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells. *The Prostate*, **53**, 211-217.
- Undeger U, Aydin S, Basaran A, Basaran N. 2004. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitimycin C induced DNA damage. *Toxicology Letters*, **151**, 143-149.
- Upton GV. 1984. Therapeutic considerations in the management of the climacteric. A critical analysis of prevalent treatments. *J. Reprod. Med*, **29**, 71-80.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, in press.
- Walle T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, **36**, 829-837.
- Wierman ME. 2007. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advan. Physiol. Educ.*, **31**, 26-33.
- Wise PM. 2002. Estrogens and neuroprotection. *Endocrinol Metab.*, **13** (6), 229-230.
- Women's Health Initiative Steering Committee. 2004. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy. *J. Am Med Assoc*, **391**, 1701-1712.
- Writing Group for the Women's Health Initiative investigators. 2002. Risk and benefits of estrogen plus progestin in health postmenopausal women. Principal results from the Women's Health Initiative, randomized controlled trial. *JAMA*, **288**, 321-333.

Yasui T, Uemura H, Tezuka M, Yamada M, Minoru I, Miura M, Aono T. 2001. Biological effects of HRT in relation to serum estradiol levels. *Horm. Res*, **56**, 33-44.

Yelena MJ, Courtney GS, Anuja C, Ningli C, Erinn LS, Linda ZP, David A, Michael K, Elizabethy. 2003. Bcl-xl/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *The EMBO Journal*, **22**, 5459-5470.

Yokomizo A, Moriwaki M. 2005. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 693-699.

Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, Nishino H, Aoije A. 1990. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEB*, **260** (1), 10-13.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. 2001. The Machinery of Programmed Cell Death. *Pharmacol Ther*, **92**, 57-70.

Ziwei H. 2000. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene*, **19**, 6627-6631.