

***Gentiana lutea*: exemplo de planta amarga com
potencial ação citotóxica**

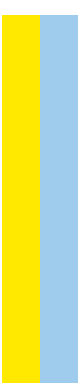
Cátia Patrícia Tavares Rodrigues

M
2017



***Gentiana lutea*: exemplo de planta amarga com
potencial ação citotóxica**

Cátia Patrícia Tavares Rodrigues



Cátia Patrícia Tavares Rodrigues

***Gentiana lutea*: exemplo de planta amarga com potencial ação citotóxica**

2017

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Tradicional Chinesa submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Orientador

- Professor Doutor Amin Karmali
- Categoria: Professor Coordenador Principal
- Afiliação: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

Co-Orientador

- Professor Doutor Jorge Machado
- Categoria: Professor Associado
- Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

Co-Orientador

- Professora Doutora Maria Begoña Criado
- Categoria: Professor Adjunto Principal
- Afiliação: Instituto Politécnico de Saúde do Norte - CESPU

**“What we call the beginning is often the end
And to make an end is to make a beginning
The end is where we start from.”
T. S. Eliot**

AGRADECIMENTOS

À Família,

Mãe, por seres quem és.

Pai, por me trazeres a este caminho.

Mana, por nunca me deixares cair.

Matilde e Pedro, por me mostrarem o milagre da vida.

João, pela persistência e constância.

Aos Professores,

Prof. Greten, pela dádiva deste imenso conhecimento.

Prof. Frank, por me inspirar a ser cada dia melhor.

Prof. Jorge Machado, pelo incansável esforço na realização desta enorme visão.

Prof. Amin Karmali e Prof. Maria Begoña, pela ajuda na concretização desta tese.

Prof. e amiga Maria João Santos, pelo tremendo exemplo que és.

Aos Colegas e Amigos,

Pelas preciosas orientações, maiores do que as próprias palavras.

Pelas horas de estudo e partilha.

Pela luz com que iluminam o meu dia.

Pelas reflexões que nos permitem evoluir.

Pela evolução que representam.

A todos os que tão simplesmente fazem parte da minha vida, por me acompanharem no ser e crescer.

Também à Natureza, pela abundância que me proporciona e por me mostrar o caminho por onde caminhar.

O meu profundo obrigado.

RESUMO

Introdução: O cancro é uma doença com incidência crescente e é já a segunda causa de morte em todo o mundo. As terapêuticas anticancerígenas existentes têm permitido prolongar a vida destes doentes mas apresentam algumas desvantagens como a elevada taxa de efeitos adversos e o desenvolvimento de resistências. A Medicina Tradicional Chinesa tem-se afirmado como uma importante figura neste campo, sendo crescente o interesse do mundo Ocidental nesta medicina milenar que utiliza vários métodos terapêuticos como a acupuntura e a fitoterapia chinesa. Esta última tem por base a utilização de plantas para o tratamento de doenças. De facto, é reconhecido o contributo que os produtos naturais têm dado para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, nomeadamente para o tratamento do cancro, estando o potencial da fitoterapia chinesa ainda por explorar.

Métodos: O objetivo deste trabalho foi fazer um estudo preliminar sobre o efeito que o extrato aquoso e etanólico de *Gentiana lutea* têm sobre duas linhas celulares de carcinoma humanas, HeLa e MCF-7. Recorrendo a microplacas de 96 poços, foram testadas várias concentrações de extratos e a viabilidade celular foi avaliada durante 72 horas através do teste de redução de MTT.

Resultados: Os dois extratos aparentam ter ações contrárias nas duas linhas celulares testadas. O extrato aquoso apresentou um efeito citotóxico às 24 horas e um aumento da viabilidade às 72 horas. Por sua vez, o extrato etanólico aparenta provocar um aumento da viabilidade às 24 horas e um efeito citotóxico às 72 horas.

Discussão e conclusão: Os resultados deste estudo preliminar sugerem que a *Gentiana lutea* exerce uma ação citotóxica e proliferativa sobre as linhas celulares testadas, sendo esta ação dependente do tempo de exposição e do tipo de extrato. Estes dados suportam a realização de um estudo mais alargado com vista à identificação dos compostos biológicos bem como a identificação do(s) mecanismo(s) de ação envolvido(s).

ABSTRACT

Introduction: Cancer is a disease with increasing incidence and is already the second cause of death worldwide. The existing anticancer therapies have prolonged the life time of this patients but present disadvantages such as adverse events and development of resistances. Traditional Chinese Medicine has been recognized as an important player in this area, with increasing interest from the Western world in this ancient form of medicine that uses various therapeutic methods as acupuncture and herbal therapy. The last is based on the use of plants to treat diseases. In fact, natural products are an important contributor to the development of new therapeutic strategies, especially anticancer drugs, and the potential of Chinese herbal therapy is still to explore.

Methods: The goal of this work was to perform a preliminary study on the effect that the aqueous and ethanolic extract of *Gentiana lutea* have on two human cancer cell lines, HeLa and MCF-7. Using 96-well plates, various concentrations of the extracts were tested and cell viability was assessed for 72 hours using MTT reduction test.

Results: The two extracts appear to have opposite actions in the two cell lines tested. The aqueous extract showed a cytotoxic effect seen at 24 hours and an increase in cell viability ~~shown~~ at 72 hours. In turn, ethanolic extract seems to cause an increase in cell viability at 24 hours and a cytotoxic effect at 72 hours.

Discussion and conclusion: The results of this preliminary study suggest that *Gentiana lutea* exerts a cytotoxic and proliferative action on the cell lines tested, showing time and extraction dependent results. These data support the realization of further studies to elucidate the identification of biological compounds and the underlying mechanisms of action.

ÍNDICE GERAL

	Página
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE QUADROS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. A DOENÇA CANCERÍGENA	3
2.1 Biologia do cancro	4
2.1.1 Importância do microambiente tumoral	6
2.1.2 Angiogénese e inflamação	7
2.1.3 Metastização	9
2.1.4 Influência do Sistema Nervoso Autónomo e do Sistema Imunitário	10
2.1.5 Fatores psicossomáticos e emocionais	11
2.2 Cancro da mama	13
2.3 Cancro do colo do útero	14
2.4 Novos horizontes da terapêutica anticancerígena	15
3. MEDICINA TRADICIONAL CHINESA: MODELO DE HEIDELBERG	18
3.1 <i>Yin e Yang</i>	19
3.2 Fases e orbes	20
3.3 <i>Qi, Xue e Shen</i>	22
3.4 Agente	22
3.5 Patogénese	24

	Página
3.6 Diagnóstico de acordo com o Modelo de Heidelberg	25
3.7 Teoria <i>Algor Leadens</i> (ALT).....	26
3.8 Cancro segundo o modelo de Heidelberg	27
3.8.1 <i>Qi defensivum vs Qi construtivum</i>	28
3.8.2 <i>Qi vs Xue</i>	29
3.8.3 Orbe pulmonar vs Orbe hepática	30
3.8.4 Fase Metal vs Fase Madeira.....	31
3.8.5 <i>Maeror vs Ira</i>	32
3.8.6 Fatores de risco para o desenvolvimento de cancro	33
3.8.7 De que forma se desenvolve o cancro?	34
3.9 Abordagens terapêuticas em MTC: a fitoterapia chinesa	37
3.9.1 <i>Sapor</i>	38
3.9.2 Relação com a orbe.....	39
3.9.3 Comportamento de temperatura	39
3.9.4 Tendência funcional do fitofármaco	40
3.9.5 Tratamento do cancro através da fitoterapia chinesa	40
4. GENTIANA LUTEA: PERSPETIVA CONVENCIONAL E TRADICIONAL.....	43
4.1 Metabolitos secundários de plantas chinesas como fonte de novos fármacos	44
4.2 <i>Gentiana lutea</i>	45
4.2.1 Perspetiva convencional	46
4.2.2 Uso tradicional	49
4.2.3 Analogias entre as duas visões	50
4.2.4 Atividade anticancerígena de outras plantas amargas e frias	51
5. MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1 Reagentes	53
5.2 Planta e extratos.....	54
5.2.1 Extrato etanólico	55
5.2.2 Extrato aquoso.....	55
5.3 Manutenção da cultura celular	57
5.4 Curva de crescimento das linhas celulares	59
5.5 Teste MTT	60

	Página
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.1 Curvas de crescimento	66
6.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico em Hela	69
6.3 Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso em Hela	71
6.4 Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico em MCF-7	73
6.5 Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso em MCF-7	75
6.6 Extrato etanólico versus extrato aquoso	76
6.7 Limitações do estudo	77
6.8 Perspetivas futuras	79
7. CONCLUSÃO.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Desenvolvimento de tumores policlonais	5
Figura 2 - Processo de carcinogénese com envolvimento das células do microambiente tumoral	6
Figura 3 - Representação esquemática da angiogénese	7
Figura 4 - As metástases podem derivar de um clone predominante ou de um clone minoritário do tumor primário	9
Figura 5 - Consequências somáticas do stress.....	12
Figura 6 - Microambiente tumoral	16
Figura 7 - Curva sinusoidal de <i>yin</i> e <i>yang</i>	19
Figura 8 - Curva sinusoidal com a representação das fases	20
Figura 9 - Curva sinusoidal com a representação das fases e proposta dos mecanismos fisiológicos associados	21
Figura 10 - Representação esquemática das componentes do diagnóstico funcional de MTC	25
Figura 11 - Representação esquemática do modelo de ALT.....	27
Figura 12 - Desequilíbrio entre <i>Qi defensivum</i> e <i>Qi construtivum</i>	29
Figura 13 - Desequilíbrio entre <i>qi</i> e <i>xue</i>	30
Figura 14 - Desequilíbrio entre a orbe hepática e a orbe pulmonar	31
Figura 15 - Desequilíbrio entre a fase Metal e a fase Madeira	31
Figura 16 - Desequilíbrio entre a <i>maeror</i> e <i>ira</i>	33
Figura 17 - Patofisiologia do cancro de acordo com o modelo de Heidelberg de MTC	36
Figura 18 - Representação dos sabores	38
Figura 19 - Objetivos da utilização da fitoterapia chinesa como adjuvante à terapêutica anticancerígena clássica	42
Figura 20 - <i>Gentiana lutea</i>	45

	Página
Figura 21 - Compostos isolados de <i>G. lutea</i>	46
Figura 22 - Ação de substâncias amargas sobre o sistema digestivo	47
Figura 23. Curva sinusoidal com representação dos sabores	50
Figura 24 - Raiz de <i>Gentiana lutea</i>	54
Figura 25 - Extrato etanólico bruto	55
Figura 26 - Extrato aquoso bruto	56
Figura 27 - Fluxograma de preparação dos extratos e concentrações a testar	57
Figura 28 - Fluxograma manutenção da cultura celular	59
Figura 29 - Perfil de crescimento celular para uma linha celular cultivada <i>in vitro</i>	60
Figura 30 - Metabolização mitocondrial do MTT a formazan em células viáveis	61
Figura 31 - Fluxograma do teste de MTT para construção da curva de crescimento .	62
Figura 32 - Fluxograma do teste de MTT para avaliação do extratos de <i>G. lutea</i>	63
Figura 33 - Desenho do estudo	65
Figura 34 - Sais de formazan em HeLa	66
Figura 35 - HeLa em crescimento em frasco T75, com detalhe de divisão celular	68
Figura 36 - MCF-7 em crescimento em frasco T75, com detalhe de divisão celular ...	69

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Capacidades adquiridas dos das células cancerígenas	5
Quadro 2 - Descrição das funções das fases	22
Quadro 3 - Orbes yin e orbes yang de acordo com a sua fase	22
Quadro 4 - Descrição das 4 formas de desenvolver doenças, de acordo com o modelo de Heidelberg.....	24
Quadro 5 - Descrição dos Critérios Guia	26
Quadro 6 - Fatores envolvidos no desenvolvimento de cancro	28
Quadro 7 - Descrição de emoções associadas às orbes	32
Quadro 8 - Descrição dos seis sabores	39
Quadro 9 - Atividades descritas de algumas plantas utilizadas em MTC para o tratamento de cancro	41
Quadro 10 - Atividades descritas de algumas decocções utilizadas em MTC para o tratamento de cancro	42
Quadro 11 - Moléculas com atividade anticancerígena isoladas ou desenvolvidas a partir de metabolitos secundários de plantas utilizadas em MTC	44
Quadro 12 - Atividades biológicas descritas de diferentes extratos de <i>G. lutea</i>	47
Quadro 13 - Compostos isolados da espécie <i>G. lutea</i> e atividades biológicas descritas...	49
Quadro 14 - Comparação dos efeitos do extrato etanólico e aquoso em HeLa e MCF-7 ...	76

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 - Curvas de crescimento de HeLa, a várias concentrações celulares por poço	67
Gráfico 2 - Curvas de crescimento de MCF-7, a várias concentrações celulares por poço	68
Gráfico 3 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	70
Gráfico 4 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	70
Gráfico 5 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	71
Gráfico 6 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa a uma concentração celular de 10^5 , na presença de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	71
Gráfico 7 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	72
Gráfico 8 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	72
Gráfico 9 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato aquoso de <i>G. lutea</i>	73
Gráfico 10 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de extrato aquoso de <i>G. lutea</i>	73
Gráfico 11- Evolução da viabilidade celular em função do tempo para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	74

Gráfico 12 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato etanólico de <i>G. lutea</i>	74
Gráfico 13 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de <i>G. lutea</i>	75
Gráfico 14 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para MCF-7, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de <i>G. lutea</i>	75
Gráfico 15 – Evolução da viabilidade celular em função da concentração para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato aquoso de <i>G. lutea</i>	76
Gráfico 16 – Evolução da viabilidade celular em função da concentração para MCF-7, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de extrato aquoso de <i>G. lutea</i>	76

ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	<i>Algor Leadens theory</i>
BCL2	Oncogene <i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	Gene supressor tumoral <i>breast cancer 1</i>
BRCA2	Gene supressor tumoral <i>breast cancer 2</i>
CSCs	Células estaminais cancerígenas
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
EX.	Exemplo
FBS	Soro Bovino Fetal
HeLa	Linha celular de carcinoma epitelial do colo do útero
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor – type 2</i>
HPV	Vírus do papiloma humano
IC50	Concentração que causa 50% de inibição
Ig	Imunoglobulina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
MCF-7	Linha celular de adenocarcinoma humano da mama
NK	<i>Natural killers</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintetase
Nm	Nanómetros
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
RPM	Rotações por minuto
RAS	Oncogene <i>Rat sarcoma</i>
SN	Sistema nervoso
RASMCs	Células do músculo liso da aorta de ratos
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio vascular

1.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde a doença cancerígena é a segunda causa de morte mundial (1). Conseqüentemente, a investigação nesta área é intensiva e multidisciplinar, sendo que diversos estudos confirmaram a eficácia da utilização conjunta de terapêuticas convencionais e não convencionais (2).

Desde sempre que o Homem procura métodos para promover e preservar a saúde e combater a doença. A Medicina Tradicional engloba todas as técnicas de diagnóstico e terapêuticas utilizadas desde tempos ancestrais com este objetivo, sendo a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) um desses sistemas terapêuticos. Em resumo, a MTC baseia-se no conceito de sistemas funcionais que se estabelecem pela organização sistemática das observações das diferentes manifestações e fenómenos biológicos, valoriza a interdependência corpo-mente e a integração e interação indivíduo-ambiente (3). Diferencia-se da Medicina Convencional, entre outros aspetos, por não procurar estabelecer o diagnóstico em função de determinações imagiológicas ou laboratoriais, mas antes em manifestações mais subtis, muitas vezes antecessoras de doenças estabelecidas (4).

Um dos ramos terapêuticos da MTC é a fitoterapia chinesa. É reconhecido que os produtos naturais são uma indiscutível fonte de novas estratégias terapêuticas para as mais diversas áreas médicas (5). Tendo isso em linha de conta, o objetivo desta tese de mestrado foi estudar a possível atividade citotóxica de uma planta utilizada em MTC, a *Gentiana lutea*, perante duas linhas celulares de carcinoma humano. Pretende ser um estudo de *screening* que, recorrendo à avaliação da citotoxicidade de extratos desta planta, contribuirá para um melhor conhecimento da atividade biológica das plantas utilizadas em fitoterapia chinesa.

Ao longo dos capítulos introdutórios 2 e 3 abordar-se-á a interpretação da doença cancerígena do ponto de vista da medicina convencional e da MTC, procurando os pontos de convergências e analogias.

No capítulo 4 apresenta-se resumidamente a planta em estudo, nomeadamente quanto aos usos medicinais e atividades biológicas descritas.

Nos capítulos 5 e 6 descrevem-se os métodos de estudo utilizados e os resultados obtidos, com a respetiva discussão.

No capítulo final tiram-se as necessárias conclusões, estabelecem-se as perspetivas de trabalho futuro nesta área e fazem-se as reflexões finais.

2.

A DOENÇA CANCERÍGENA

A doença cancerígena é a segunda causa de morte mundial, a seguir às doenças cardiovasculares (1). Em Portugal, o cancro de pulmão/brônquios, colorretal e próstata são os mais comuns nos homens, e o cancro de mama, colorretal e tireoide são os mais comuns nas mulheres (6). O cancro é a principal causa de morte antes dos 70 anos de idade, ou seja, é a principal causa de morte prematura (7).

A causa da doença cancerígena envolve alterações genéticas, hereditárias ou adquiridas, e epigenéticas, muitas vezes alavancadas por fatores externos tais como tabaco, químicos, radiação e doenças infecciosas, que promovem conjuntamente a carcinogénese. Genericamente, o cancro pode ser tratado através de cirurgia, radioterapia e terapêutica farmacológica (quimioterapia, hormoterapia, imunoterapia e terapêuticas direcionadas).

2.1

BIOLOGIA DO CANCRO

Cancro, ou neoplasia maligna, é um termo que abrange um amplo número de doenças. É caracterizado pela multiplicação celular descontrolada e pela aquisição de capacidade invasiva e metastática, ou seja, de originar doença à distância. Quando não existe esta capacidade invasiva são denominadas neoplasia benignas (8).

Os cancros classificam-se de acordo com o tecido e tipo de célula onde se originam. Carcinomas, por exemplo, são cancro originados nas células epiteliais e são o tipo de cancro mais comum, possivelmente porque a maior parte da proliferação celular acontece em tecidos epiteliais (9). Sarcomas são cancros derivados de tecido conjuntivo ou muscular e os que derivam de células sanguíneas são denominados leucemias e linfomas.

Na maior parte dos casos, a sucessiva acumulação de alterações genéticas levam a alterações fenotípicas como a ativação de oncogenes (ex: RAS, BCL2) e/ou a desativação de genes supressores de tumores (ex. p53), o que desencadeia um ciclo celular descontrolado e a inativação dos mecanismos de apoptose (10; 11).

Quadro 1 – Capacidades adquiridas das células neoplásicas. Adaptado de (12-14).

- Autossuficiência em fatores e recetores proliferativos
- Desvio aos mecanismos de controlo dos processos de proliferação e diferenciação celular
- Escape da apoptose
- Potencial replicativo ilimitado
- Angiogénese sustentada
- Invasão de tecidos, metástases
- Imuno-escape
- Maior capacidade de captar glucose

Durante muitos anos o desenvolvimento do cancro foi atribuído a mecanismos puramente genéticos. No entanto, atualmente considera-se que muita da complexidade do cancro se deve também à epigenética (11; 15; 16). As alterações epigenéticas consistem na modificação da expressão genética sem alteração da sequência de nucleótidos da cadeia de ácido desoxirribonucleico (ADN) mas antes através de pequenas alterações da molécula de ADN, como por exemplo a metilação (11).

A acumulação progressiva das alterações genéticas e epigenéticas resulta numa população policlonal de células que tem comportamentos clínicos distintos e que desencadeia respostas diferentes ao tratamento, embora se tratem de tumores que do ponto de vista do diagnóstico têm a mesma classificação (13; 16; 17).

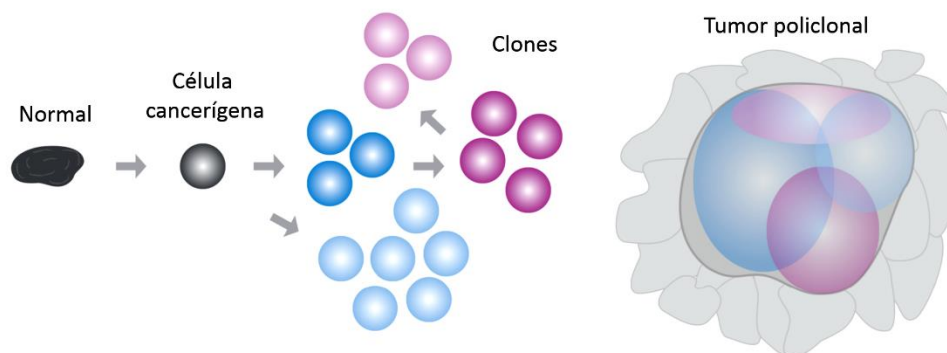


Figura 1 – Desenvolvimento de tumores policlonais. Adaptado de (18).

Existem dois modelos que explicam o crescimento tumoral: o primeiro está baseado na ideia de que todas as células contribuem para a elevada capacidade de divisão celular e o segundo está assente na existência de células estaminais cancerígenas (CSCs – *cancer stem cells*), denominadas, por outros autores, de células progenitoras de cancro (11; 17;

19). A identificação de CSCs já foi efetuada no cancro de mama, colorretal, próstata, pulmão, entre outros (17). A existência de múltiplos clones tem várias implicações clínicas, nomeadamente ao nível do desenvolvimento de resistências ao tratamento e da metastização.

2.1.1

A importância do microambiente tumoral

O microambiente que envolve a lesão cancerígena é também parte do processo de carcinogénese, sendo esta uma visão holística do desenvolvimento do cancro (9; 16; 19; 20). Este microambiente é composto por várias células, tais como células endoteliais, células do músculo liso, fibroblastos, neutrófilos, granulócitos, linfócitos T, B e células NK (*natural killers*), células dendríticas, entre outras, e todas têm um papel na progressão tumoral (9).

Conforme mostra a figura ao lado, durante a carcinogénese as células epiteliais e do estroma podem sofrer alterações que promovem a mutação e a proliferação epitelial (1). Estas alterações à homeostasia dos tecidos desencadeiam respostas inflamatórias que potenciam a proliferação e a ativação das células do microambiente, por exemplo, desencadeando a neovascularização (2). A hiperplasia e displasia continuadas podem levar a um estado neoplásico (3 e 4) e invasivo.

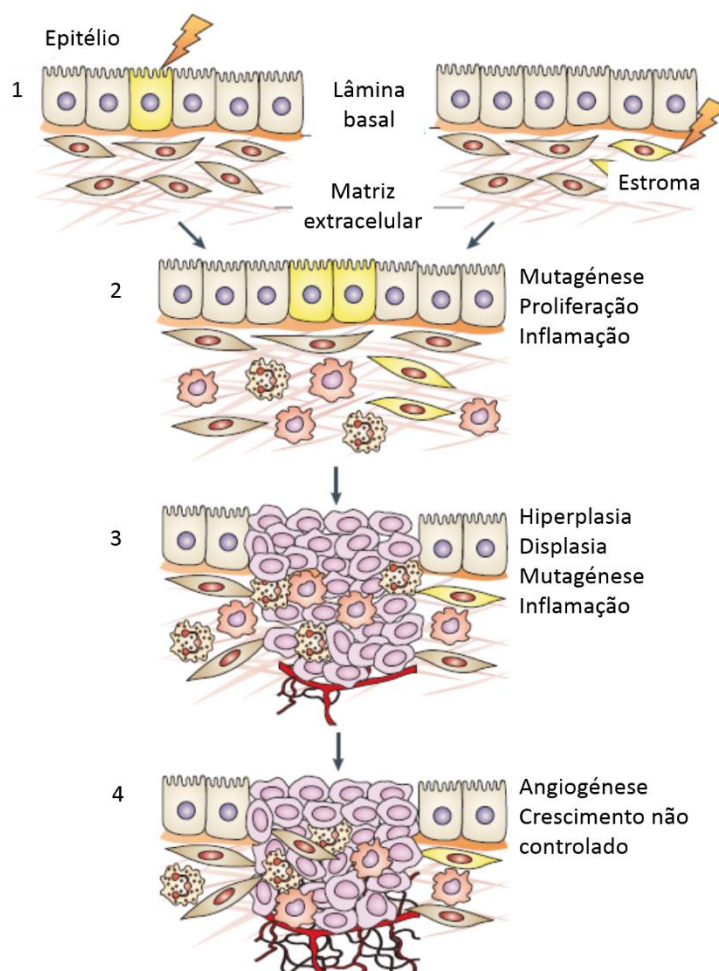


Figura 2 - Processo de carcinogénese com envolvimento das células do microambiente tumoral. As alterações genéticas e epigenéticas estão representadas a amarelo. Adaptado de (9).

2.1.2

Angionéese e inflamação

A formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais é essencial ao desenvolvimento de órgãos, cicatrização de ferimentos e processos inflamatórios. É um processo altamente regulado e está envolvido em doenças como a artrite reumatoide, retinopatia diabética e o desenvolvimento tumoral (8; 21). Os dois importantes fatores intervenientes neste processo são o fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (21; 22).

Nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral, normalmente quando o tumor tem menos de dois milímetros de diâmetro, a nutrição da massa tumoral faz-se essencialmente por difusão a partir dos tecidos vizinhos. Acima deste tamanho, e para assegurar a sua sobrevivência, os tumores passam a depender de vasos próprios (8). A angiogénese e a metastatização tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem uma tríade de eventos fisiopatológicos como a mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular (8).

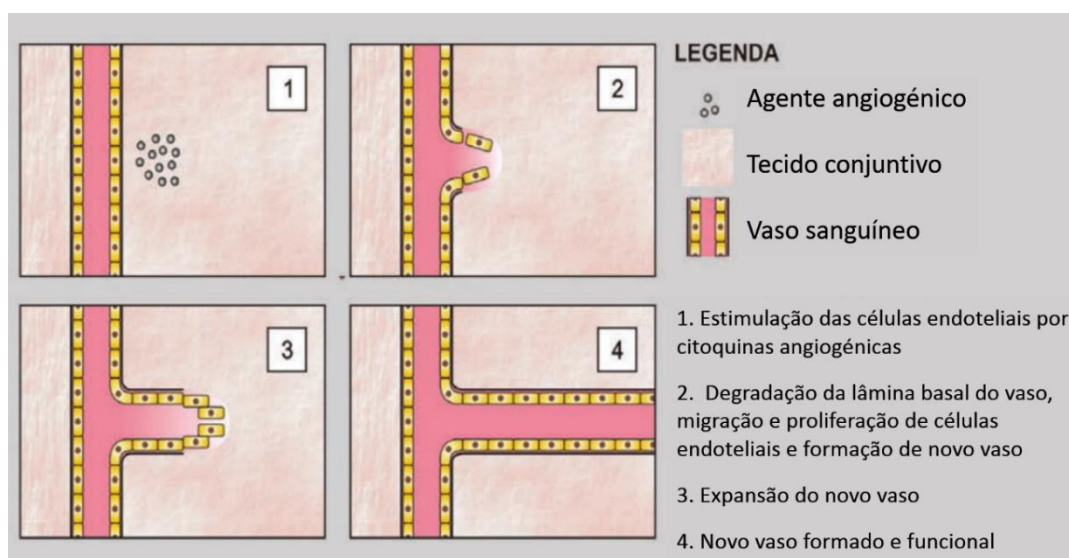


Figura 3 - Representação esquemática da angiogénese. Adaptado de (8).

Tal como foi referido acima, a angiogénese contribui para o desenvolvimento de tumores sólidos e ocorre também nos processos inflamatórios (23). Por outro lado, quadros inflamatórios crónicos causam danos nos tecidos envolvidos, o que pode proporcionar condições pró-carcinogénicas (23). Atualmente sabe-se que as doenças inflamatórias crónicas podem aumentar o risco de cancro (24; 25). Acredita-se que cerca de 25% dos cancros podem ter origem em processos inflamatórios e infecciosos crónicos, tais como

cancro do pulmão, mama, cólon e próstata (24; 26). Outros exemplos da relação entre a inflamação e a carcinogénese incluem o aumento das taxas de cancro esofágico em doentes com refluxo gastro-esofágico e o aumento do risco de cancro do pulmão em doentes com bronquite crónica e enfisema (24). A inflamação promove a progressão neoplásica devido à produção de espécies reativas de oxigénio, citoquinas promotoras de crescimento, inibição de genes supressores de tumores e a estimulação de determinadas vias de transdução (26). Um exemplo é o fator nuclear kappa B (NF- κ B), uma proteína produzida durante a inflamação que serve como fator de transcrição que regula a expressão de genes inflamatórios e pró-tumorais (26; 27). A produção desta proteína é regulada pelo nível oxidativo da célula e controla a expressão de genes envolvidos na imunidade, inflamação e escape à apoptose (28). O aumento do fator NF- κ B é frequentemente encontrado em células malignas e é considerado um fator de sobrevivência celular, com ação anti-apoptótica (28).

Outra molécula importante nos processos inflamatórios é o óxido nítrico (NO) (28). O NO é um radical livre altamente reativo produzido pela NO sintetase (NOS) (28). Tanto o NO como a NOS são ubíquos em tumores malignos e têm uma ação simultaneamente pro e anti-inflamatória (28). A interação entre o NO e a p53 parece ser crucial para a carcinogénese mediada pela inflamação (28).

Adicionalmente, estudos mostraram que a prostaglandina E2 (PGE2), produzida pela ciclo-oxigenase-1 e 2 (COX-1 e 2) desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral de muitos tumores sólidos, incluindo cólon, mama, cabeça e pescoço, útero e estômago (28; 29). Em muitos tumores sólidos foram encontrados níveis elevados de COX-2, mas não de COX-1, uma vez que a primeira é induzível e está aumentada em processos inflamatórios (28; 29). Por essa razão a COX-2 é o alvo preferencial de intervenção terapêutica anti-inflamatória e a administração de anti-inflamatórios não esteroides mostrou diminuir o tamanho de adenomas em animais (28). A ação pró-tumoral da COX-2 foi demonstrada pela redução de 40-50% do risco de cancro colorretal em pessoas saudáveis que tomam regularmente anti-inflamatórios não esteroides. Sendo assim, a inibição seletiva da COX-2 poderá ser uma promissora estratégia de terapêutica anticancerígena (28).

O cancro e inflamação são, então, processos intimamente relacionados, perpetuando-se mutuamente, o que leva a que alguns autores vejam os tumores como feridas que não cicatrizam (9; 30). Por outro lado, a angiogénese patológica promove o recrutamento de células inflamatórias, que por sua vez promovem a angiogénese pela produção de VEGF,

TNF- α e outras citoquinas, o que exacerba e fomenta o ciclo vicioso angiogênese-inflamação-angiogênese, criando-se assim o terreno fértil para o desenvolvimento da doença neoplásica (23; 27).

2.1.3

Metastização

A metastização é um processo complexo que envolve a desagregação do tumor primário através da i) alteração das adesinas celulares e desagregação da massa tumoral, ii) migração das células cancerosas pelo sistema linfático ou sanguíneo, iii) ancoramento no sistema capilar do órgão alvo e iv) reinício da multiplicação celular através de diferentes interações célula-célula e célula-matriz (8; 17). A capacidade metastática agrava enormemente o prognóstico e aumenta a mortalidade da doença (31; 32).

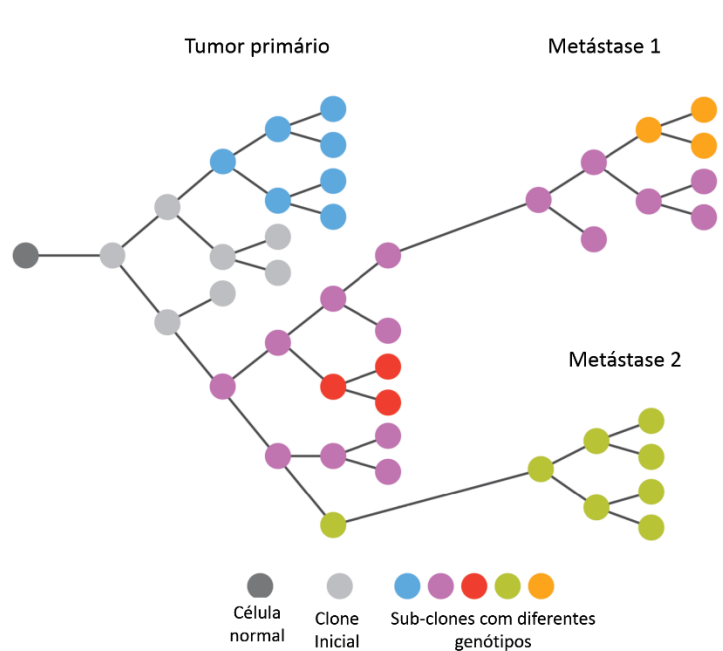


Figura 4 - As metástases podem derivar de um clone predominante ou de um clone minoritário do tumor primário. Podem também evoluir e originar novos clones (como indica a metástase 1).

Adaptado de (18).

As duas principais vias de disseminação das células tumorais são a circulação linfática e circulação sanguínea (22). Recentemente, a via neuronal tem sido considerada, através de um mecanismo ainda pouco estudado que tem por nome invasão de fibras neuronais periféricas, em que as células neoplásicas invadem e migram em redor e através dos nervos (15; 22).

2.1.4

Influência do Sistema Imunitário e do Sistema Nervoso Autônomo

O sistema imunitário tem a capacidade de detetar e controlar o desenvolvimento neoplásico, sendo a resposta imunológica celular, nomeadamente ao nível das células NK, de particular importância para esta ação (13; 22; 33; 34). O sistema imunitário tem a capacidade de imunovigilância e de imunoedição, ou seja, a ação imunológica seleciona os clones tumorais que não são sensíveis à sua ação, um processo denominado de imunotolerância (13; 22; 33-35). A ação do sistema imunitário pode então levar a três resultados: eliminação do tumor por parte do sistema imunitário, estabelecimento de um equilíbrio entre a população celular cancerígena e a ação do sistema imunitário e o escape dos mecanismos imunitários e criação de novos clones malignos (34; 35).

A forte estimulação destes mecanismos protetores é, portanto, uma estratégia terapêutica de particular importância, principalmente se considerarmos que as células tumorais podem manter-se dormentes durante muito tempo até causarem uma recaída no processo de cura, recaída essa muitas vezes associada à diminuição da função imunitária (19). Adicionalmente, a quimioterapia e a radioterapia destroem as células do sistema imunitário, tornando o doente cada vez mais vulnerável à doença que pretendem tratar (33; 34).

Atualmente sabe-se que o sistema nervoso (SN) autónomo regula a expressão de genes nos tumores primários e no seu microambiente (36). Estudos recentes mostraram que as fibras nervosas do SN simpático e SN parassimpático infiltram tumores prostáticos e gástricos, contribuindo para o desenvolvimento tumoral, invasão dos tecidos e metastização (15). O SN simpático modula a expressão genética que promove a metastização dos tumores sólidos através da promoção da inflamação, angiogénese, invasão dos tecidos e inibição da resposta imunitária e apoptose (22; 36; 37). Os tumores sanguíneos são também modulados pelo SN simpático mas a sua influência está menos esclarecida, podendo ser uma ação indireta através do sistema imunitário (36; 37). Em relação à divisão parassimpática, e embora alguns autores tenham uma opinião contrária, existe a hipótese de que o nervo vago tenha ação anti-inflamatória, o que poderá abrandar a progressão tumoral (37). Esta ação anti-tumoral parece estar particularmente relacionada com o desenvolvimento de cancro do estômago (38).

O interesse pelo estudo da influência do SN simpático na progressão da doença cancerígena teve origem do facto de a experiência clínica ter mostrado que existe uma relação entre o stress e o desenvolvimento de cancro (36). Estudos *in vivo* com modelos

animais mostraram que comportamentos stressantes, desencadeados pela ativação do SN simpático, podem acelerar a progressão de tumores da mama, próstata, ovário, melanomas, entre outros (36). Nos referidos modelos animais, os efeitos biológicos do stress podem ser bloqueados por antagonistas beta-adrenérgicos (36).

A ativação β -adrenérgica estimula a produção de interleuquinas pro-inflamatórias por parte de células tumorais e vários estudos mostram que a estimulação adrenérgica da via inflamatória pode estimular o crescimento tumoral e a metastização. Sabe-se também que a via β -adrenérgica pode estimular onconeges e reduzir os mecanismos de reparação do ADN e que, por outro lado, antagonistas β -adrenérgicos reduzem a progressão tumoral (36; 39). A sinalização β -adrenérgica pode também inibir a função de linfócitos T e de células NK, o que diminui a resposta imunitária ao cancro (36). Em contraste com os efeitos estimulatórios na inflamação e ação macrófágica, o SN simpático inibe a produção de interferões de tipo I e II, importantes na resposta imunológica contra cancros causados por vírus. Ou seja, o sistema nervoso influencia o desenvolvimento do tumor pela interferência com o sistema imunitário e com os mecanismos inflamatórios e de tumorigénese (22; 37).

A metastização é a maior causa da elevada mortalidade em tumores sólidos. Apesar dos importantes avanços científicos nesta área, o diagnóstico de doença à distância continua a ter um prognóstico fraco. Como vimos anteriormente, a metastização acontece através de 4 etapas nas quais as funções imunitárias, interações com o microambiente e mecanismos inflamatórios estão envolvidos (22). Estas funções são direta ou indiretamente reguladas pelo sistema nervoso (22).

2.1.5

Fatores psicossomáticos e emocionais

Os estudos epidemiológicos mostraram que o stress psicológico e social pode estar associado à iniciação tumoral, possivelmente pela ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) (15; 27). Por outro lado, pessoas que são muito afetadas pelo stress e que têm respostas emocionais negativas estão associadas a maior incidência de cancro, pior sobrevida e maior mortalidade (27).

De acordo com a psiconeuroimunologia, o stress psicológico e emocional induz várias respostas biológicas, como por exemplo, a ativação do eixo hipotálamo – pituitária - adrenal e do SN autónomo, o que, como vimos anteriormente, pode causar alterações na resposta imunitária e promover inflamação (37). Ao nível do sistema imunitário, estes fatores

causam uma diminuição dos níveis de linfócitos T e células NK, o que diminui a vigilância contra células metastáticas, aumentando o risco de metástases (22). Naturalmente, como resultado ocorrem piores prognósticos, piores resultados clínicos e pior qualidade de vida na doença cancerígena (22; 31).

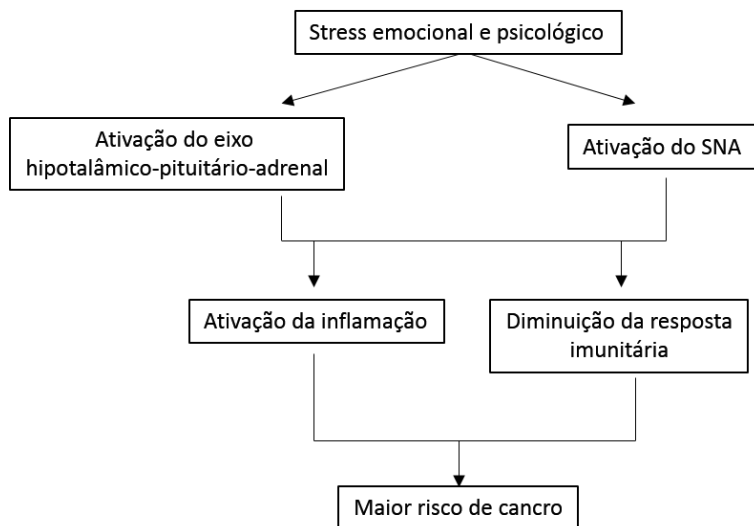


Figura 5 - Conseqüências somáticas do stress. Adaptado de (34).

Outros fatores psicossomáticos foram relacionados com maior incidência de cancro de mama, pulmão, cabeça e pescoço, hepatobiliar e linfóide (27). Por exemplo, a depressão diminui a ação do sistema imunitário, levando à diminuição dos níveis de linfócitos T e células NK (27). Adicionalmente, a depressão está muitas vezes associada a doenças inflamatórias e o aumento de marcadores inflamatórios está relacionado com quadros depressivos (27).

De acordo com o modelo de Temoshok's, os principais traços de personalidade que aumentam o risco de cancro de mama são a supressão de emoções e a tendência de adiar as próprias necessidades face às necessidades dos outros (40). Lydia Temoshok denominou estas características de personalidade tipo C, ou seja, personalidade propensa a cancro, que se caracteriza também por lidar com a perda e mudanças stressantes na vida manifestando sintomas depressivos (40).

Em resumo, o desequilíbrio ao nível das emoções pode facilitar e desencadear a tumorigênese (41; 42). O conhecimento de que existe uma interdependência entre o corpo e a mente há muito é evidenciado por outros modelos de biologia humana, como a Medicina Tradicional Chinesa ou a Medicina Ayurvédica (27). Tal como Hipócrates afirmou há mais

de 2500 anos, “é mais importante saber quem é a pessoa que tem a doença, do que qual é a doença que a pessoa tem” (43).

2.2

CANCRO DA MAMA

O cancro da mama é um tumor maligno das células epiteliais da mama (33; 43). É o cancro mais frequente em mulheres e a sua incidência aumenta com a idade (6; 43). A nível mundial, na população feminina, o cancro da mama contribui para 29% dos novos casos de cancro e para 15% da mortalidade relacionada com cancro (43). Em Portugal, em 2010, a taxa de incidência foi de 118,5 casos por 100 000 casos de tumores malignos e a taxa de mortalidade foi de 15,9 por 100 000 casos, sendo a maior mortalidade observada acima dos 85 anos (6). O número de novos casos tem vindo a aumentar, não só devido a um aumento real da incidência da doença, mas também por um diagnóstico mais precoce (33; 44). Por sua vez, a mortalidade está a diminuir também devido ao diagnóstico mais precoce e ao crescente sucesso terapêutico (33; 44).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de cancro incluem a idade, sexo, mutações genéticas, mais especificamente a presença de mutações nos genes BRCA1 (*breast cancer 1*) ou BRCA2 (*breast cancer 2*), história familiar de cancro de mama, primeira gestação em idade tardia, não aleitamento materno, nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, exposição a estrogénios, radiações ionizantes, consumo de álcool e obesidade (33; 43; 44). Por outro lado, uma dieta equilibrada combinada com a prática regular de exercício físico, a gestação do primeiro filho próxima dos 20 anos e a amamentação ao peito parecem ser fatores protetores contra o desenvolvimento do cancro da mama (44).

Para a caracterização molecular do tumor da mama é importante a identificação de 3 recetores: recetores hormonais de estrogénio e progesterona e o HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor - type 2*). Cerca de 70% dos cancros da mama são RE positivos, o que permite a terapêutica com moléculas antagonistas dos estrogénios (45). Por sua vez, o HER2 está presente em cerca de 25% dos cancros de mama e é considerado um fenótipo mais agressivo e de pior prognóstico (43; 45). O cancro da mama triplo negativo não expressa nenhum destes três biomarcadores (RE, RP e HER2) e por isso tende a desenvolver-se e a metastizar mais rapidamente e não responde à terapêutica hormonal ou à terapêutica inibidora do HER2 (33; 43; 45). A mutação nos genes supressores

tumorais BRCA1 e BRCA2 aumenta o risco de cancro de mama entre 40% a 80% aos 70 anos (43).

Um fator chave para o tratamento de qualquer tipo de cancro é a deteção precoce e o diagnóstico preciso da doença. O tratamento do cancro da mama depende do estágio da doença na altura do diagnóstico, grau histológico, presença ou ausência de determinados recetores e mutações genéticas. O arsenal terapêutico inclui terapias locais e terapias sistémicas:

- Tratamento local
 - Intervenção cirúrgica (cirurgia conservadora ou mastectomia)
 - Radioterapia
- Tratamento sistémico
 - Quimioterapia (ex: taxanos)
 - Terapêutica hormonal (ex: tamoxifeno, inibidores da aromatase)
 - Terapêutica imunológica/biológica (ex: anticorpos monoclonais inibidores do HER2) (43; 45)

2.3

CANCRO DO COLO DO ÚTERO

Os vírus do papiloma humano (HPV) são os agentes etiológicos do cancro do colo do útero, sendo praticamente a única causa desta neoplasia (46; 47). A diversidade dos HPV está bem descrita, existindo mais de 200 subtipos (46).

Com a implementação de programas de rastreio nos países industrializados, a incidência de cancro do colo do útero tem vindo a diminuir (47; 48). No entanto, em todo o mundo, este continua a ser a segunda causa de morte por cancro nas mulheres, muito por conta dos baixos cuidados de saúde dos países em desenvolvimento (47). Em Portugal, em 2010, a taxa de incidência foi de 13,5 por 100 000 casos de tumores malignos (6). A sobrevida relativa global aos 5 anos foi de 63,9% (ajustada para a idade), enquanto a média europeia (EUROCARE-4) foi de 60,4%, resultado influenciado pelas medidas de rastreio implementadas (48). Em 2010 a taxa de mortalidade situou-se nos 4,1 por 100 00 casos, sendo a maior taxa de mortalidade observada entre os 80 e os 84 anos (6).

O principal fator de risco para cancro de colo do útero é a infeção pelo HPV (47; 48). No entanto, outros co-fatores que poderão influenciar a progressão da infeção pelo HPV até cancro do colo do útero são, por exemplo, tabagismo, idade precoce de início da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, história de doenças sexualmente transmissíveis,

parceiros sexuais de alto risco, alta paridade, imunocomprometimento e uso de anticoncepcionais orais (47; 48).

O HPV é adquirido por contacto sexual com um parceiro infetado, não necessariamente através de relações sexuais (47). A maior parte das infeções são assintomáticas e mais de 90% das infeções detetadas desaparecem ao fim de dois anos, possivelmente por via da imunidade celular (47; 49). Se a infeção for persistente e não foi tratada existe 30% de risco de evoluir para formas invasivas de cancro nos 30 anos seguintes (46; 47). O diagnóstico é feito na maioria das vezes através de uma citologia cervical de rotina ou por biópsia a uma área suspeita (48).

Existem cerca de 12 subtipos oncogénicos de HPV: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (49). Os subtipos 16 e 18 são os mais agressivos e são responsáveis por 70% dos casos de cancro do colo do útero invasivo em todo o mundo (49). O subtipo 16 é o mais carcinogénico, sendo a causa de 55 a 60% de todos os cancros de colo do útero (47).

O tratamento do cancro do colo do útero, que depende do diagnóstico, inclui:

- Intervenção cirúrgica
- Radioterapia
- Quimioterapia (ex: cisplatina)
- Imunoterapia (ex: bevacizumab)
- Vacinas (47)

As vacinas têm sido usadas para tratar formas recorrentes e persistentes mas também como medida preventiva (47). Aliado à vacinação, os testes de Papanicolau continuam a ser uma das principais formas de rastreio que têm reduzido de forma efetiva a incidência de cancro do colo do útero (47).

2.4

NOVOS HORIZONTES DA TERAPÊUTICA ANTICANCERÍGENA

A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são atualmente as principais formas de combater o cancro (50). Para além dessas, existe também a terapêutica hormonal, imunoterapia, entre outras terapêuticas dirigidas. Embora estas terapêuticas tenham como alvo as células neoplásicas ou os mecanismos por elas promovidos, estão associadas a múltiplos efeitos adversos como risco de complicações pós-cirúrgicas, linfoedema, fadiga, anemia, náusea e diarreia, queda de cabelo, imunossupressão e aumento do risco de

doenças infecciosas (51). Estes efeitos adversos, para além de causarem uma diminuição da qualidade de vida dos doentes, limitam a utilização destes tratamentos em doses terapêuticas e comprometem o sucesso do tratamento (51).

Conforme vimos acima, a população celular no cancro é muito heterogénea. Dois tumores com o mesmo diagnóstico têm populações policlonais diferentes e por isso comportamentos clínicos distintos (10).

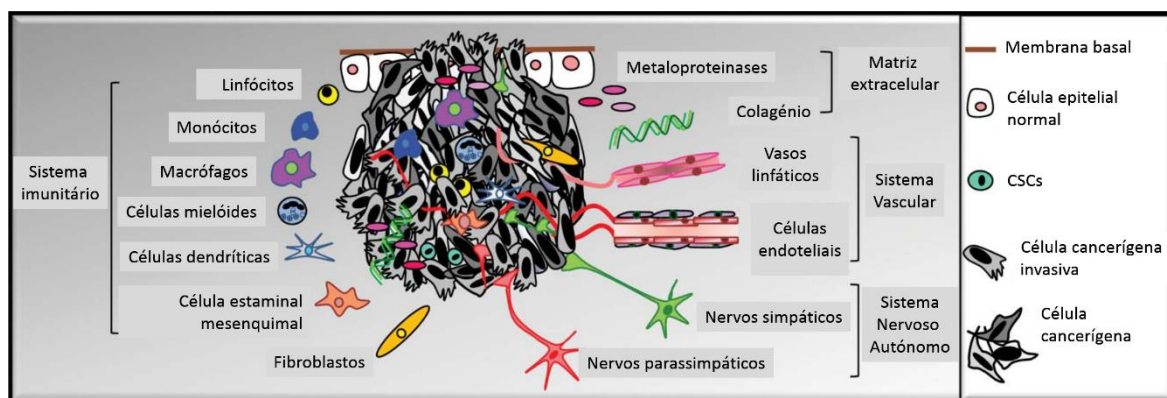


Figura 6 - Microambiente tumoral. Adaptado de (15).

O tratamento quimio ou radioterápico da doença oncológica está baseado na ideia de que a população celular é homogénea (17). Esta estratégia promove o desenvolvimento de resistências, por selecionar os clones que não respondem ao tratamento administrado, eventualmente até pela seleção das CSCs anteriormente referidas (17; 50). A resistência ao tratamento advém também do facto das células tumorais resistentes escaparem ao controlo do sistema imunitário (17).

A terapia direcionada, mais recente e que bloqueia as vias bioquímicas que são fundamentais ao crescimento tumoral, embora menos tóxica, tem também efeitos adversos e também promove o desenvolvimento de resistências (50). Adicionalmente, tal como a imunoterapia, tem um preço elevado o que limita o acesso ao medicamento (51).

A toxicidade e os efeitos adversos dos tratamentos convencionais, que essencialmente procuram atuar em apenas um alvo, tem impulsionado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com abordagens conceptualmente diferentes (50). Os seus objetivos gerais são:

1. Aumentar as baixas taxas de resposta devido ao desenvolvimento de resistências;
2. Diminuir a elevada taxa de ocorrência de efeitos adversos;

3. Diminuir interações farmacológicas não desejadas, sejam entre medicamentos sejam entre medicamentos e produtos fitoterápicos;
4. Melhoria da qualidade de vida dos doentes (52; 53).

Em resposta ao comportamento individual de cada tumor, devido à sua apresentação policlonal, a terapêutica oncológica há muito que procura adaptar o tratamento a cada doente, providenciando a terapia certa, nas quantidades certas (13). Esta abordagem personalizada foi desde sempre a estratégia terapêutica da MTC. Por outro lado, os estudos sobre a influência que o SN autónomo tem na patofisiologia do cancro têm permitido concluir que todo o organismo regula os eventos locais do microambiente tumoral e têm permitido considerar outras formas de intervenção terapêutica. Como veremos adiante, o SN autónomo é na verdade o alvo da intervenção da Medicina Tradicional Chinesa, definida pelo modelo de Heidelberg, como um sistema de sensações e descobertas com o objetivo de estabelecer um estado vegetativo funcional de cada pessoa (4).

Acresce dizer que a acupuntura tem-se revelado de enorme utilidade nos doentes com cancro. Vimos anteriormente que um baixo nível de células NK aumenta o risco de cancro (54). Estas células têm um elevado número de recetores adrenérgicos e colinérgicos, pelo que são influenciadas pelo sistema simpático e parassimpático (54). Os estudos têm mostrado que a modulação autonómica exercida pela acupuntura aumenta o número destas importantes células do sistema imunitário (33; 34).

Assim sendo, o conhecimento das teorias da MTC e dos seus métodos terapêuticos poderá permitir abrir os horizontes do tratamento da doença neoplásica. Nesta tese será abordada a contribuição que a fitoterapia chinesa pode dar neste tema em particular.

3.

MEDICINA TRADICIONAL CHINESA: MODELO DE HEIDELBERG

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) chegou ao ocidente por via de estudiosos que viajaram até à China para aprenderem estas técnicas ancestrais e as suas raízes filosóficas e culturais (54; 55). Prof. Manfred Porket foi uma dessas pessoas que, para além disso integrou a linguagem clássica da MTC nos conhecimentos científicos ocidentais (3; 56-58). Essa sistematização foi amplamente aprofundada pelo Prof. Greten, dando origem ao modelo de Heidelberg (4; 59). Trata-se de um modelo que permite entender a MTC do ponto de vista científico, integrando a referida linguagem e conceitos da MTC nos conceitos médicos ocidentais (4). É, portanto, uma metodologia científica e integrativa, que procura decodificar a linguagem clássica da MTC, por vezes profundamente filosófica e metafórica, por meio de uma abordagem racional e lógica, de forma a torná-la acessível à comunidade científica, aos profissionais de saúde e aos pacientes (3; 56; 58).

Segundo o modelo de Heidelberg, a MTC é um sistema de sensações e descobertas com o objetivo de estabelecer um estado funcional vegetativo de cada pessoa. Este modelo compreende as doenças como um conjunto de sinais e sintomas, descrevendo as sensações do indivíduo como o resultado de disfunções do corpo, particularmente ao nível do sistema neurovegetativo (60). O estado neurovegetativo pode ser alterado através da acupunctura, da fitofarmacologia chinesa, do *tuina*, do *Qigong* e da dietética chinesa (4).

3.1

YIN E YANG

Yin e *yang* são conceitos basilares na MTC. São manifestações de uma dualidade, uma alternância entre dois estádios opostos, representada através de uma curva sinusoidal (Figura 7). Para Gottfried Leibniz (cientista, matemático e filósofo alemão), *yin* e *yang* são também uma forma de linguagem matemática binária de 0 e 1. (4).

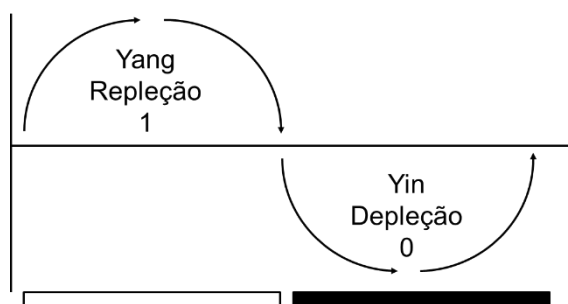


Figura 7 - Curva sinusoidal de *yin* e *yang*. Adaptado de (4; 59).

Segundo a visão de Porkert e Greten, podemos entender o *yang* como um aspeto ativo/atividade/função, enquanto o *yin* possui um aspeto mais construtivo e/ou estrutural

(4; 58). Do ponto de vista fisiológico, o *yang* e o *yin* são comparados com o sistema nervoso simpático e com o sistema nervoso parassimpático, respectivamente (61).

Sendo o *yin* um conceito que se refere à estrutura, pode ser subdividido em (4):

- Yin sui generis (aparato celular)
- Xue
- Fluídos (fatores de hidratação, iões necessários ao correto funcionamento da célula)
- Jing (comparável com o DNA, pode ser afetado por radiação ou quimioterapia ou ter uma deficiência genética)

3.2

FASES E ORBES

As leis da regulação indicam que a maior parte dos processos de regulação estão baseados em flutuações periódicas em torno de um valor alvo. A curva sinusoidal é a codificação desse fenómeno, podendo também ser apelidado de circular, i.e, cibernético. Aplicando este conceito à regulação do sistema vegetativo obtém-se a linguagem das fases e orbes, descrita de seguida (62).

Yin e *yang* são os dois extremos de uma polaridade, mas quando se torna necessário descrever a transição de um polo para outro uma outra nomenclatura é utilizada: a das fases. Segundo Greten, *yin* e *yang* podem ser divididos em 4 fases, denominadas Madeira, Fogo, Metal e Água, mais a Terra (4). Nas fases *yang* (Madeira e Fogo) as funções simpáticas como a vasoconstrição, aumento da tensão arterial, aumento da glicogenólise e lipólise, estão mais predominantes. Já nas fases *yin* (Metal e Água) a atividade parassimpática demonstrada pela vasoconstrição, diminuição da tensão arterial, aumento da motilidade gastrointestinal, é mais dominante. Para além disso existe um vetor centrípeto que aproxima a curva do seu centro, sendo representado pela Terra (4).

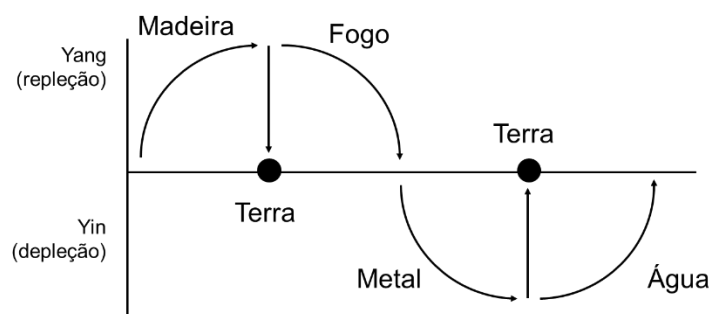


Figura 8 - Curva sinusoidal com a representação das fases. Adaptado de (4; 59).

Uma fase faz parte do processo circular, sendo na verdade um termo cibernético que significa regulação. Quando o termo fase é aplicado ao ser humano, traduz um estado vegetativo funcional em que as suas manifestações surgem como grupos de sinais clínicos relevantes para o diagnóstico, chamados orbes (4). Ou seja, as fases revelam tendências da regulação da homeostasia vegetativa.

Genericamente, as fases de Madeira e Fogo são caracterizadas por um estado vegetativo de hipertónus e hiperdinâmica, respetivamente, e as fases de Metal e Água por um estado hipotónico e hipodinâmico, respetivamente (4). A estas fases da curva vegetativa sinusoidal propõe-se que correspondam, de acordo com a fisiologia ocidental, mediadores hormonais conforme se indica na figura 9. Note-se que as fases têm vetores associados, que caracterizam também a sua manifestação vegetativa.

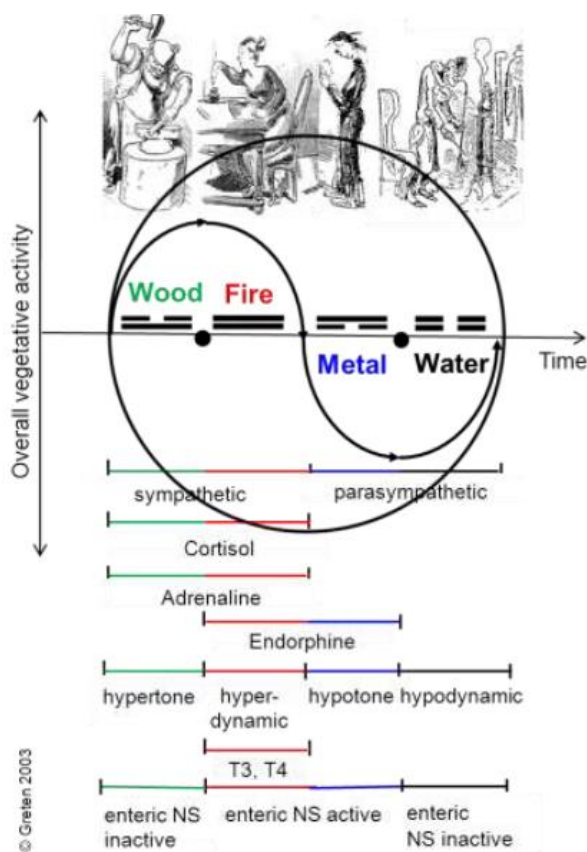


Figura 9 - Curva sinusoidal com a representação das fases e proposta de mecanismos fisiológicos associados (4; 59).

De uma forma resumida:

Quadro 2 - Descrição das funções das fases. Adaptado de (4).

Fase Madeira	Representa as funções neurovegetativas simpáticas, como a vigília, controlo da excitabilidade muscular, libertação de prostaglandinas em processos pré-inflamatórios. Relacionada com vertigens, náuseas, hipertensão e processos inflamatórios.
Fase Fogo	Mecanismos psíquicos (ex.: associação mental, controlo das emoções); movimentos motores finos, circulação sanguínea. Relacionada com distúrbios mentais, racionais e palpitações.
Fase Metal	Primeira parte do ciclo que contra-regula as funções simpáticas: mio-relaxamento, respiração, hidratação e nutrição dos tecidos.
Fase Água	Regeneração de energia, dos tecidos e dos fluidos corporais.
Fase Terra	Movimentos peristálticos, finalização da cascata de libertação de prostaglandinas no processo inflamatório; funções parassimpáticas como assimilação e metabolismo dos açúcares e aminoácidos. Quando há deficiência desta fase, verificam-se fenómenos, como hiper-insulinismo, edemas nos membros inferiores, Diabetes Mellitus tipo 2, síndrome metabólico.

Cada fase é composta por duas orbes, à exceção da fase Fogo que se subdivide em 4 orbes. Em cada par de orbes, uma tem características *yin* (interno, estrutura), e outra tem características *yang* (externa, função) (58). Para Greten uma orbe é uma manifestação clínica de uma fase que tem o nome de uma zona corporal (4).

Quadro 3 - Orbes *yin* e orbes *yang* de acordo com a sua fase. Adaptado de (4).

Fase	Orbes <i>Yin</i>	Orbes <i>Yang</i>
Madeira	Hepática	Felleal
Fogo	Cardial	Tenuintestinal
	Pericardial	Tricalórico
Metal	Pulmonar	Crassintestinal
Água	Renal	Vesical
Terra	Estomacal	Lienal

De acordo com o modelo de Heidelberg, uma orbe é também um grupo de sinais com relevância para o diagnóstico que indica o estado funcional de uma zona corporal e que se relaciona com as propriedades funcionais de um conduto (4). Quanto maior a tendência vegetativa (fase) maior a probabilidade de surgirem sintomas (orbes).

Para Greten, um conduto é um grupo de pontos com efeitos nos sinais de uma orbe, possivelmente servindo para o fluxo de *qi* e *xue*, conceitos descritos de seguida (4).

3.3

QI, XUE E SHEN

O modelo de Heidelberg define *qi* como a capacidade funcional dos tecidos ou órgãos para exercer uma função, podendo causar sensações como fluxo ou pressão (4).

Para o modelo de Heidelberg, *xue* é uma forma de capacidade funcional ligada aos fluidos corporais e com funções de aquecer, hidratar, “criar” *qi* e nutrir os tecidos, sendo movido pelo *qi* no sistema de condutos (4). Pode dizer-se que o *xue* é o lado *yin* do *qi*. *Xue* pode ser dividido em 3 partes: os fluidos corporais, o *qi constructivum* e o *shen*. Do ponto de vista da medicina ocidental, *xue* pode ser comparado aos efeitos da microcirculação, incluindo suas relações funcionais, células sanguíneas, fatores plasmáticos, endotélio e parênquima (4).

Greten define *shen* como a capacidade funcional de colocar em ordem a associatividade de ideias e emoções, criando assim a presença mental. O estado funcional do *shen* é avaliado por sinais como a coerência do discurso, o brilho nos olhos e função motora fina ajustada (4). Do ponto de vista de medicina ocidental, o *shen* é comparável à capacidade para exercer certas funções cerebrais superiores (63).

3.4

AGENTE

Um agente é um fator patogénico, isto é, um vetor funcional que causa desvios às propriedades funcionais do indivíduo, levando a estados de desregulação do sistema vegetativo. Este agente gera sinais clínicos próprios, ativando as orbes (4). Os agentes podem ser divididos da seguinte forma:

- Agentes externos: *Algor* (frio), *Humor* (humidade), *Ventus* (vento), *Ardor* (rubor, inflamação), *Aestus* (golpe de calor), *Ariditas* (secura);
- Agentes internos: *Voluptas* (alegria), *Ira* (raiva), *Maeror* (tristeza), *Timor* (medo), *Pavor* (choque); *Solicitude* (Preocupação); *Cogitatio* (excesso de pensamento);
- Agentes neutros: excesso de trabalho, stress, maus hábitos alimentares, álcool, drogas, tabaco, acidentes e traumatismos (64).

Tomemos como exemplo o stress. É amplamente aceite que o stress desencadeia respostas simpáticas como o aumento da adrenalina, do cortisol, da tensão muscular e da frequência cardíaca (36). Na linguagem da MTC, este conjunto de sintomas são manifestações da orbe hepática (fase Madeira) e diz-se que o agente neutro stress causa a ativação da orbe hepática. Como veremos adiante, desequilíbrios da orbe hepática estão intimamente envolvidos no desenvolvimento de cancro.

O *humor* e o *algor* são os dois agentes mais frequentes. O *humor* pode ser considerado como uma alteração da distribuição de fluidos, *ie.* edema ou pré-edema (4), estando possivelmente relacionado com o aumento da permeabilidade capilar, por trauma ou descompensação dos tecidos. *Algor* é considerado uma diminuição da microcirculação (4).

3.5

PATOGÉNESE

Ortopatia é, de acordo com o modelo de Heidelberg, a capacidade de auto-regulação do organismo para obter um estado ideal de regulação (*i.e.*, um estado de saúde) e é também em si o estado de correta regulação (4).

Os mecanismos responsáveis pela doença, à luz do modelo de Heidelberg da MTC, podem ser quatro, conforme mostra o quadro seguinte:

Quadro 4 - Descrição das 4 formas de desenvolver doenças, de acordo com o modelo de Heidelberg. Adaptado de (4; 58).

Mecanismo	Descrição
Dificuldade de transição de fase	A transição contínua de uma fase para a seguinte não ocorre, o que causa bloqueios que levam à dominância de funções.
Desequilíbrio entre agonista e antagonista dentro de uma fase	Quando estamos perante um desequilíbrio de agonista e antagonista, uma das fases irá estar em excesso em relação à outra, levando à predominância de sinais característicos dessa fase. Por exemplo, a fase Madeira tem que estar em equilíbrio com sua fase antagonista, o Metal.
Excesso ou persistência de um agente	Se um agente estiver presente continuamente, a respetiva fase será ativada continuamente, causando sintomas.
Deficiência de <i>yin</i>	Esta expressão descreve uma deficiência estrutural e pode referir-se a qualquer um dos 4 tipos de <i>yin</i> .

3.6

DIAGNÓSTICO DE ACORDO COM O MODELO DE HEIDELBERG

Segundo o Modelo de Heidelberg o diagnóstico interpreta as informações obtidas através da constituição, agentes e orbes de acordo com quatro Critérios Guia (CG), tal como se ilustra na figura seguinte.

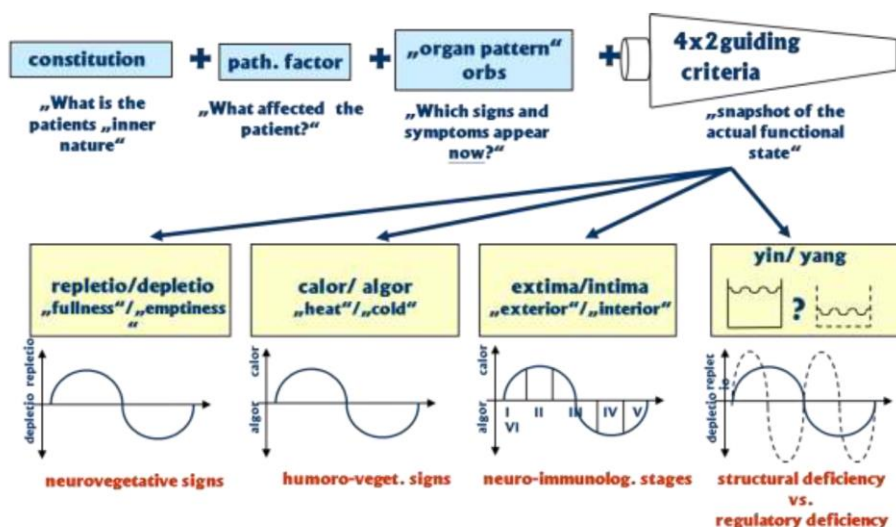


Figura 10 - Representação esquemática das componentes do diagnóstico funcional de MTC (4).

A constituição dá-nos a natureza interior do indivíduo, a sua forma de agir/reagir. É baseada no seu fenótipo e linguagem corporal (postura, o tom de voz, a expressão corporal e facial, entre outros) (65). Para o Modelo de Heidelberg a constituição é a tendência para mostrar predominantemente sinais de uma determinada orbe, de tal forma que essas manifestações ficam inscritas no seu fenótipo (4).

Os Critérios Guia são o sistema de interpretação dos sinais e sintomas do indivíduo, permitindo avaliar o seu estado funcional e de regulação vegetativa. Esta regulação é, então, avaliada a quatro níveis, de acordo com quatro modelos fisiológicos:

Quadro 5 - Descrição dos Critérios Guia. Adaptado de (4; 62; 63; 65).

Critério Guia	Mecanismo	Descrição
Repleção / Depleção	Neurovegetativo	Está associado aos mecanismos de ativação neurovegetativos, indicando se existe, respetivamente, excesso (repleção) ou falta (depleção) de ativação neurovegetativa no organismo.
<i>Calor / Algor</i>	Humoro-vegetativo	Associa-se aos sinais de origem humoro-vegetativa, ou seja, os efeitos da microcirculação. Estes sinais incluem (1) o efeito da doença na microcirculação sistémica e local, (2) a ativação dos fluidos corporais, desencadeando repostas vegetativas e sistémicas (ex: frequência cardíaca, volume de urina, sede). A hiperativação do <i>xue</i> (aumento da microcirculação) é designada de <i>calor</i> e a inibição da microcirculação origina sinais de <i>algor</i> .
<i>Extima / Intima</i>	Neuro-imunológico	Descreve o decurso da patologia provocada por um agente patogénico externo que invade o corpo. De acordo com Prof. Manfred Porket, este modelo descreve os sinais desencadeados pelo sistema neuro-imunológico no caso do agente <i>algor</i> invadir o sistema, desencadeando uma contra-resposta, designada por <i>calor</i> reativo.
<i>Yin / Yang</i>	Estrutura vs Regulação	Permite distinguir se os sinais decorrem de uma deficiência estrutural (<i>yin</i>) ou de desregulação primária / funcional (<i>yang</i>). Permite, portanto concluir se existe uma alteração na estrutura ou na função. No caso de haver uma alteração na estrutura, o tecido irá ser hiperativado para alcançar o mesmo nível de função. No entanto, uma vez que esta hiperregulação não pode ser mantida, será seguida de uma deficiência funcional, ou seja, após uma deficiência de <i>yin</i> segue-se uma deficiência e <i>yang</i>

3.7

TEORIA ALGOR LEADENS (ALT)

A teoria *Algor Leadens* ou *Shang Han Lun* (Teoria do Frio Nocivo) descreve a patofisiologia do processo de invasão do organismo pelo agente *algor*, o mais frequente agente causador de desregulação, e está representada no terceiro critério guia. Descrever o *algor* significa, em grosso modo, descrever as sensações e sintomas “como se” estivéssemos estado

expostos ao frio. Não obstante, a quimioterapia, assim como alguns fármacos e vírus são também formas de *algor* (4).

De acordo com esta teoria existem 6 estádios, associados a 6 níveis energéticos ou barreiras de defesa, às quais o agente *algor* terá de se sobrepor para alcançar o interior do organismo, o *yin*. Não sendo a tradução literal de sistema imunitário, descreve um conjunto de funções que, em determinados níveis, traduz funções desse sistema.

Cada um desses 6 estádios tem diferentes capacidades funcionais vegetativas. As manifestações de cada um dos estádios permitem esclarecer o diagnóstico. Os três primeiros estádios são manifestações de *yang* e os três últimos de *yin* (62; 63; 65; 66).

Em cada estádio está afetado um nível de defesa e duas orbes, conforme se verifica na figura abaixo.

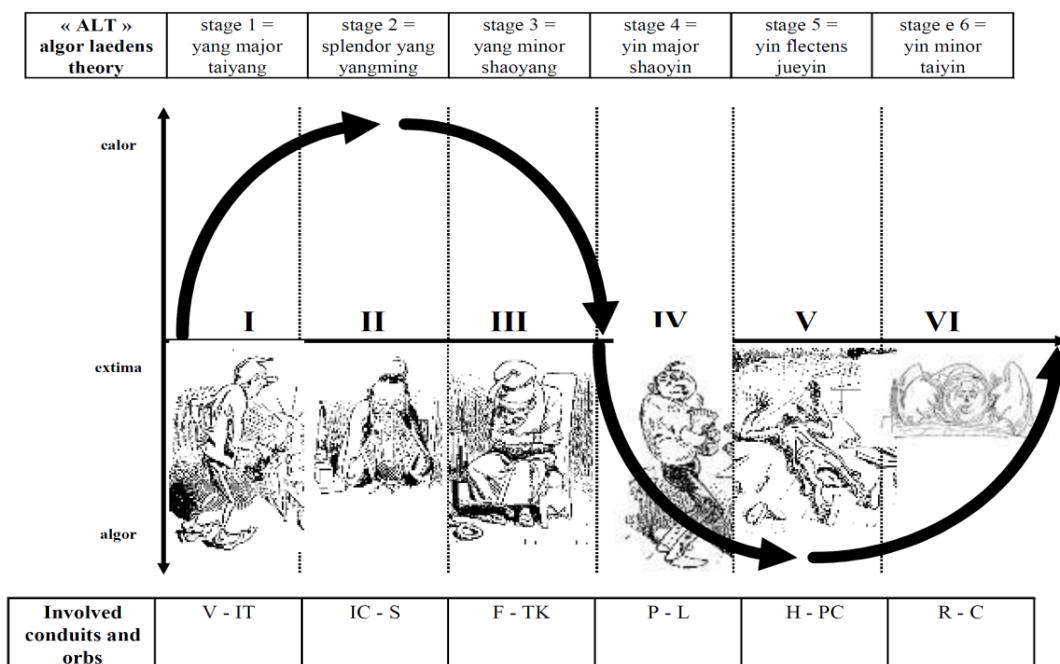


Figura 11 - Representação esquemática do modelo de ALT (66).

3.8

CANCRO SEGUNDO O MODELO DE HEIDELBERG

O modelo de Heidelberg defende que o desenvolvimento de tumores se deve a alterações vegetativas em que estão envolvidos os seguintes pares de fatores:

Quadro 6 - Fatores envolvidos no desenvolvimento de cancro.

<i>Qi defensivum</i>	vs	<i>Qi construtivum</i>
<i>Qi</i>		<i>Xue</i>
Orbe pulmonar		Orbe hepática
Fase Metal		Fase Madeira
<i>Maeror</i> (simbiose)		<i>Ira</i> (raiva)

Estas alterações vegetativas contribuem para a descompensação dos tecidos e consequente desenvolvimento de tumores. Poder-se-á dizer que criam o terreno fértil para a instalação e crescimento dos mecanismos de tumorigénese. Numa segunda etapa dar-se-á o desenvolvimento de tumores, malignos ou benignos, que se inicia na cronificação de *humor*, conforme se descreverá no capítulo 3.8 (67). Adicionalmente, para cada tipo de cancro e em cada pessoa, um ou mais mecanismos patofisiológicos são presentes e por essa razão o diagnóstico e tratamento em MTC é sempre personalizado (67). De referir que o mecanismo descrito de seguida aplica-se apenas aos tumores sólidos.

3.8.1

Qi defensivum vs Qi construtivum

De acordo com o modelo de Heidelberg o cancro desenvolve-se devido a um desequilíbrio local entre os vetores de defesa, o *qi defensivum*, e os vetores de crescimento, o *qi construtivum* (59).

O *qi defensivum* é um aspeto funcional, e por isso *yang*, das energias defensivas, sendo considerado a primeira barreira de defesa das agressões externas (58). É uma ação que se localiza na superfície do corpo, na pele e no espaço exterior dos condutos, ou seja, na *extima* (41; 42; 58). O *qi defensivum* é uma manifestação da orbe pulmonar e é o nível de energia atingido no estágio 1 do ALT. Quando este nível energético está afetado, há maior vulnerabilidade ao ataque de agentes. O *qi defensivum* aquece os tecidos, mantém o seu tónus, regula a abertura e fecho dos poros, e elimina bloqueios, tendo uma função análoga à de um limpa para-brisas, “limpando” a superfície (34). Esses bloqueios de *qi* poderão originar *qi construtivum*, um vetor de construção conforme se descreve no parágrafo seguinte. Sendo assim, esta função desbloqueante pode-se comparar à sinalização do sistema imunitário, através, por exemplo, das imunoglobulinas e consequente ação de células linfocitárias (33). O *qi defensivum* pode também ser visto como os mecanismos vegetativos de defesa dos tecidos, que são promovidos pelos movimentos de inspiração e expiração (34; 41; 42).

O *qi construtivum* é um vetor de construção e por isso *yin*. Faz parte da orbe hepática, considerada um reservatório das “energias estruturalizantes” (58). Adicionalmente, a orbe externa da fase madeira, a orbe felleal, tem também influência nas transformações de todos os tipos de energias, afetando o movimento das energias construtivas nos condutos, assim como das energias defensivas (58). O *qi construtivum* é considerado a parte do *xue* que é responsável pela reconstrução / renovação / nutrição dos tecidos (34). Por exemplo, é o *qi construtivum* que age nos músculos exaustos levando a mialgia. De acordo com a MTC, o cancro é o resultado de um excesso local de *qi construtivum*, normalmente devido a estases de *xue*, e por isso a causa da estase deve ser diagnosticada e tratada de forma prioritária (59). Do ponto de vista da patofisiologia do cancro, o *qi construtivum* pode ser encarado como os fatores de crescimento e mecanismos que criam o microambiente necessário ao desenvolvimento de cancro.

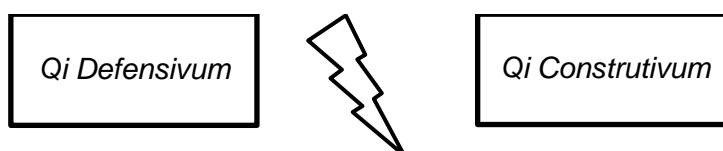


Figura 12 – Desequilíbrio entre *Qi defensivum* e *Qi construtivum*.

3.8.2

Qi vs Xue

A um nível superior de abstração pode-se referir que o desequilíbrio entre *qi defensivum* e *qi construtivum*, referido no capítulo anterior, é também um desequilíbrio entre *qi* e *xue*, este último considerado o termo análogo de microcirculação para a Medicina Ocidental.

A depleção, ou o déficit de *qi*, resulta numa tendência para o desenvolvimento de bloqueios de *qi*. Para a MTC o “*qi* guia o *xue*” por isso, em depleção de *qi*, este estagna e em consequência ocorrem estases de *xue*, identificadas pelo tom arroxeadado/azulado na língua ou nos vasos sublinguais e por uma dor em facada. Num estudo de Ji *et al*, padrões de depleção estão presentes em quase todos os pacientes de cancro (67). Um outro estudo mostrou que a estase de *xue* é um dos fatores mais prevalentes em doentes de cancro, especialmente em doentes com cancro do fígado, pulmão e pancreático, e que é também um importante fator de desenvolvimento de metástases (68). Por estas razões, para o tratamento de cancro de acordo com a MTC, ativar o fluxo normal de *qi* e *xue*, revertendo a sua estagnação, é fundamental e prioritário. *Qigong*, acupuntura, moxabustão, dietética e fitoterapia são terapêuticas essenciais para esse efeito (33).

Adicionalmente, a deficiência de *xue*, um tipo de deficiência de *yin*, frequentemente acompanha a doença cancerígena, o que causa e é causado pela deficiência de *qi*. Note-se que a quimioterapia e a radioterapia são fortes causadores de mais deficiência de *xue*. São considerados agentes de *algor* que, de acordo com o ALT, perturbam a função do *qi defensivum*, *qi* e *xue* e nesse sentido enfraquecem o sistema imunitário e agravam o estado de doença do indivíduo, o que não é de todo desejável no curso da doença cancerígena (2).

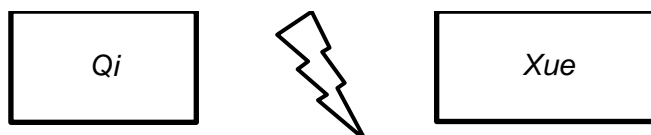


Figura 13 - Desequilíbrio entre *qi* e *xue*.

3.8.3

Orbe pulmonar vs Orbe hepática

Conforme se referiu anteriormente, o *qi defensivum* é controlado pela orbe pulmonar e o *qi construtivum* faz parte da orbe hepática. Na linguagem das orbes, o cancro é visto como um desequilíbrio entre a orbe pulmonar e a orbe hepática.

A orbe pulmonar é uma importante fonte de *qi* e distribui o *qi defensivum*. Do ponto de vista da imunologia, estudos mostraram que quando o *qi* pulmonar é baixo, a produção de linfócitos, IgG e IgM é também baixa (41; 42). Conforme descrito anteriormente, em qualquer desequilíbrio a fase Terra está afetada, uma vez que esta agrupa as funções que promovem a homeostasia. A orbe lienal, que faz parte da fase Terra, engloba funções associadas ao pâncreas e baço, sendo este último um órgão de importância vital no sistema imunitário, nomeadamente na ativação de linfócitos B e T (34). Sendo assim, a orbe lienal tem naturalmente um papel importante nos mecanismos de defesa envolvidos na doença cancerígena. Para além disto, a relação entre a orbe pulmonar e a orbe lienal explica-se pelo estágio 4 do ALT. Por outro lado, havendo uma desarmonia da fase Terra os desequilíbrios das orbes pulmonar e hepática são agravados, estabelecendo-se um ciclo vicioso de causa-efeito.

Já a orbe hepática, denominada pelos chineses por *mare xue* (mar de *xue*), é considerada um reservatório de *xue* e, em equilíbrio, mantém o livre fluxo de *qi*. A ativação da orbe hepática está diretamente relacionada com o estreitamento dos condutos, frequentemente encontrado em quadros de dor, o que promove bloqueios de *qi* e *xue*. Por outro lado,

estudos mostraram que, em pacientes com desequilíbrios da orbe hepática, a capacidade de resposta dos linfócitos estava comprometida (41; 42).

Ao longo do tempo, na presença de depleção da orbe pulmonar, esta não consegue promover as funções a orbe renal, tal como mostra a curva sinusoidal que serve de base ao modelo de Heidelberg. Juntamente com depleção da orbe lienal desenvolve-se o síndrome reno-lienal, associado ao cancro da próstata, um dos mais prevalentes nos homens (69). A orbe renal controla os mecanismos de regeneração do organismo, está associada ao sistema neuro-endócrino (41; 42).

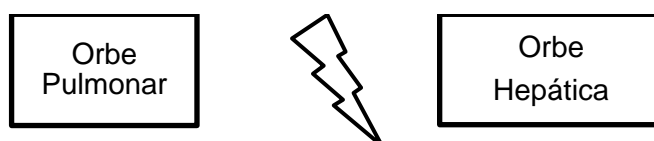


Figura 14 - Desequilíbrio entre a orbe hepática e a orbe pulmonar.

3.8.4

Fase Metal vs Fase Madeira

Optando pela linguagem das fases, desequilíbrio entre a fase Metal e a fase Madeira, fases antagonistas, predispõe para o desenvolvimento de cancro. A fase que promove o equilíbrio entre elas é a Terra.

Conforme referido anteriormente, o stress causa a ativação da orbe hepática e a expressão de *ira*, debilitando a função da orbe pulmonar e a função do *qi defensivum*. Por outro lado, orbes hepática ou felleal ativas causam a constrição dos condutos, levando a bloqueios de *qi* e posteriormente de *xue*, cujas consequências foram anteriormente descritas.

Sabe-se também que o stress pode levar a imunossupressão, o que pode diminuir a resistência a doenças cancerígenas (15; 27; 33). A diminuição da intensidade de stress poderá estar associada à diminuição da progressão e recorrência da doença cancerígena, assim como à diminuição no número de um tipo de células importantes no controlo da autoimunidade e da imunossupressão (ex: células de Treg) (33).

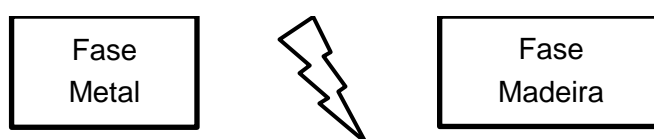


Figura 15 - Desequilíbrio entre a fase Metal e a fase Madeira.

3.8.5

Maeror vs Ira

Uma das características da MTC é ter uma visão integrada do corpo e mente. Às duas orbes, pulmonar e hepática, estão associadas duas emoções que as caracterizam. O *maeror* (i.e. simbiose, ou perda de simbiose, melancolia, tristeza) é a emoção que caracteriza a orbe pulmonar e a *ira* (i.e. autonomia, revolta, raiva) está associada à orbe hepática. Estas emoções estão muitas vezes envolvidas nas dinâmicas familiares e por isso Greten considera que o cancro é uma doença familiar e que para o seu tratamento a família deve estar também envolvida.

Note-se que ambas as designações representam um leque de emoções que, em equilíbrio, são benéficas. São os desequilíbrios que poderão causar doenças, conforme se descreve no quadro seguinte.

Quadro 7 - Descrição de emoções associadas às orbes (4)

	Fase Madeira		Fase Metal
	Orbe hepática	Orbe felleal	Orbe pulmonar
Manifestação de equilíbrio	<ul style="list-style-type: none"> - Tomada de decisões - Iniciativa - Autonomia 	<ul style="list-style-type: none"> - Controlo de impulsos - Comportamento socialmente correto - Diferenciação 	<ul style="list-style-type: none"> - Compreensão dos problemas dos outros, empatia - Lealdade
Manifestação de desequilíbrio	<ul style="list-style-type: none"> - Comportamento irático, colérico - Agressividade 	<ul style="list-style-type: none"> - Excessivo controlo de impulsos - <i>Ira</i> suprimida - Sentimentos suprimidos - Ambivalência - Frustração 	<ul style="list-style-type: none"> - Introversão - Excesso de simbiose - Baixa auto-estima - Hipersensibilidade

Em doenças cancerígenas a *ira* está normalmente suprimida, em consonância com a resposta a situações de stress, e essa supressão de *ira* e das emoções causa bloqueios de *qi* e *xue* que, conforme se referiu anteriormente, é um mecanismo que está associado ao desenvolvimento de cancro. De facto, stress, isolamento social e outros fatores emocionais poderão aumentar o aparecimento de metástases por um mecanismo que envolve o eixo hipotálamo – pituitária - adrenal e o SN autónomo (22). Vimos anteriormente que, de acordo com Temoshok's, os principais traços de personalidade que aumentam o risco de cancro de mama são a supressão de emoções e a tendência de adiar as próprias

necessidades face às necessidades dos outros, característica associada com o *maeror* / simbiose (40). Este conceito, aliado ao conhecimento de que o stress e a depressão alteram a função do sistema imunitário e do SN autónomo mostram que o desequilíbrio ao nível das emoções pode facilitar e desencadear a tumorigénese (22; 27; 36; 41; 42).

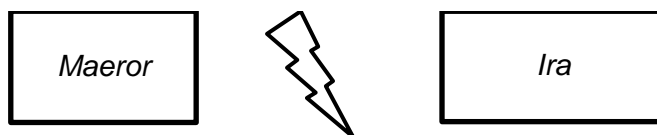


Figura 16 - Desequilíbrio entre a *maeror* e *ira*.

Em suma, para a MTC o cancro resulta de um desequilíbrio entre o *yin* e o *yang*, entre o *qi defensivum* e o *qi construtivum*, entre o eixo Madeira-Metal, resultando em estases de *qi* e *xue*. Para estas contribuem também o desequilíbrio das emoções, resultando numa apresentação multifatorial e multi-sintomática que deverá ter uma abordagem individual e personalizada.

3.8.6

Fatores de risco para o desenvolvimento de cancro

De acordo com o modelo de Heidelberg, a descompensação dos tecidos é mediada por cinco fatores principais:

- Depleção
- *Algor*
- *Humor*
- *Pituita*
- Deficiência de *yin*

Todos estes fatores afetam o *qi defensivum*. A depleção diminui o *qi defensivum* e promove padrões pulmonares, o que agrava a depleção. Havendo depleção ocorrem bloqueios de *qi* e de *xue*. Como consequência da depleção temos também o *humor* que, ao desafiar mais os mecanismos de homeostasia, causa mais depleção (33; 59).

De acordo com a teoria do ALT, a primeira barreira de defesa contra o *algor* é o *qi defensivum*, que poderá estar comprometido em quadros de depleção. Por outro lado, o *algor* perturba diretamente a função do *xue* (66).

O *humor* reduz também a função do *qi defensivum*, por facilitar a ocorrência de bloqueios e por originar, ao longo do tempo, a *pituita*. Esta desenvolve-se a partir de humor e em quadros de *calor*, que consome os fluidos corporais, aumenta a tendência para a existência de bloqueios e agrava a deficiência de *yin* ao nível dos fluidos e do *xue* (33; 59).

Por último, a fraca resistência dos tecidos ou mesmo a sua deficiência, designada por deficiência de *yin* em MTC, causa maior dificuldade de regulação, mais instabilidade, mais *calor*, mais *humor* e, conseqüentemente, mais depleção. Tratar e prevenir a depleção é de vital importância para prevenir a doença cancerígena e para melhorar o seu prognóstico (4; 33).

3.8.7

De que forma se desenvolve o cancro?

Fase 1

Do ponto de vista da sua patofisiologia de MTC, o desenvolvimento do cancro inicia-se com o desenvolvimento de *humor* pois, como foi referido anteriormente, sempre que existe uma descompensação funcional existe a formação de *humor*. O *humor* pode evoluir para um estado mais condensado denominado *pituita*, que pode ser considerado um estado mais condensado dos fluidos (56). Do ponto de vista ocidental poderão ser os produtos excedentes e resultantes de processos inflamatórios que não são devidamente eliminados (ex: imunocomplexos, mediadores inflamatórios). Está descrita a relação entre a *pituita* e alterações da expressão de citocinas inflamatórias, como o TNF-alfa, assim como outras associadas à proliferação de mioblastos e infiltração de macrófagos envolvidos no cancro (34). Na linguagem da MTC *pituita* é um sinal de processos crónicos. *Humor* e *pituita* agravam quadros de bloqueios que possam existir (33). Até esta fase existe um risco acrescido de desenvolvimento de cancro, ainda sem doença estabelecida.

Fase 2

A fase seguinte é o aparecimento de matérias com textura gelificada e móvel, denominado de *congelatio*. Esta é considerada a fase antecessora do crescimento tumoral e deve ser considerado um sinal de alarme. Quistos (nódulos) e exsudados crónicos são um exemplo desta situação (2; 33).

Fase 3

Com o tempo o *congelatio* tende a tornar-se mais denso, como um nódulo duro, sendo já tecido neoplásico, como um lipoma ou fibroma. Este tipo de manifestação indica que existe

um bloqueio no fluxo de *qi* e *xue* e excesso de *qi construtivum*. Pode ser benigno ou maligno (2; 33; 56).

Tendo em conta o acima disposto, poder-se-á propor um mecanismo de desenvolvimento de cancro à luz do modelo de Heidelberg de MTC conforme a figura 17. Considerando os mecanismos descritos, é agora compreensível que os cancros de pulmão (fase Metal – orbe pulmonar), mama (fase Terra) e cólon (fases Metal – orbe crassintestinal) sejam dos mais prevalentes. Ou seja, existe uma correspondência entre este modelo de MTC e os dados epidemiológicos quanto à incidência de cancro.

Para a Medicina Ocidental o desenvolvimento de cancro está baseado nas mutações genéticas e alterações epigenéticas, em que o equilíbrio dos oncogenes e genes supressores tumorais está comprometido. Por outro lado, a regulação destes genes é feita por moléculas intra e extracelulares. O modelo de Heidelberg de MTC baseia-se na compreensão dessa regulação do ponto de vista do SN autónomo (ou vegetativo). Conforme se descreveu no capítulo 2, o SN autónomo regula a expressão de genes em tumores primários e no seu microambiente (22; 36).

Adicionalmente, a ativação do SN simpático promove a inflamação e a angiogénese, processos que se assemelham ao segundo Critério Guia deste modelo (36). Conforme descrito anteriormente, também a resposta imunitária é influenciada pelo SN autónomo (36), o que se pode assemelhar aos conceitos de fases e à importante teoria do ALT.

Adicionalmente, stress, depressão e outros fatores emocionais podem aumentar as metástases pela libertação de hormonas associadas ao eixo hipotálamo – pituitária - adrenal e ao SN Autónomo, o que está em linha com o postulado de que *ira* e *maeror* contribuem para o desenvolvimento de cancro (22; 54).

Verificando-se a analogia consistente entre o entendimento ocidental e este modelo de MTC, a visão do modelo de Heidelberg sobre doença cancerígena poderá ser vista como a teoria vegetativa de cancro.

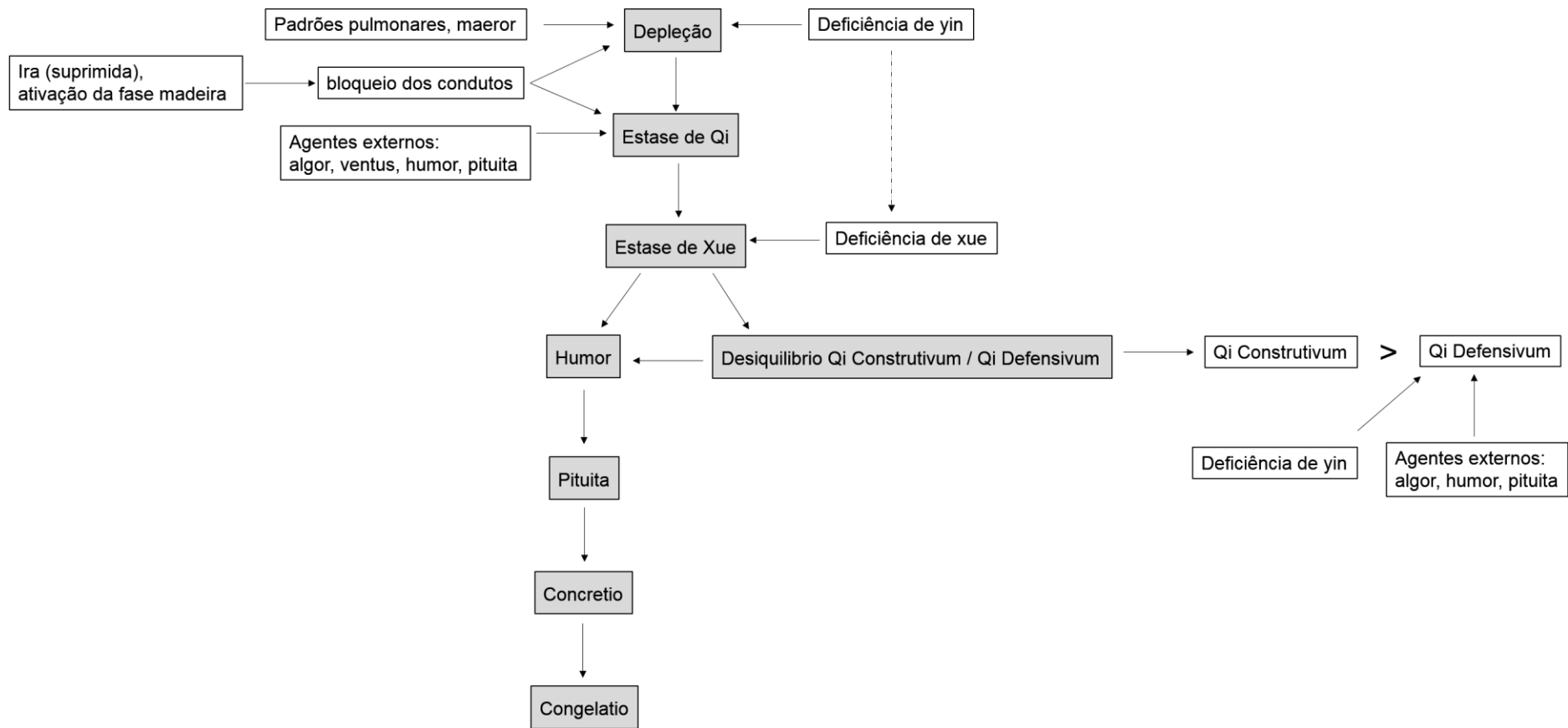


Figura 17 - Patofisiologia do cancro de acordo com o modelo de Heidelberg de MTC. Adaptado de (59).

ABORDAGENS TERAPÊUTICAS EM MTC: A FITOTERAPIA CHINESA

A MTC está dividida nos seguintes campos de atuação:

1. Acupuntura e Tuina, desencadeiam ações reflexas a nível do Sistema Nervoso Central e Periférico;
2. QiGong, definido como uma técnica de ativação do sistema de biofeedback;
3. Fitoterapia Chinesa, a administração de plantas, minerais e outros produtos, normalmente em decocção;
4. Dietética Chinesa, aconselhamento alimentar de acordo com os princípios de MTC (2; 4; 62; 65)

Após o diagnóstico individualizado que tem como objetivo identificar os mecanismos predominantes em cada paciente, o tratamento e prevenção do cancro de acordo com o modelo de Heidelberg está assente em 4 pilares:

- Remover estases de *xue*
- Regular do fluxo de *qi*
- Eliminar agentes
- Tratar os cinco fatores de risco para o desenvolvimento de cancro

Para isso as todas as abordagens terapêuticas são fundamentais, sendo que a fitoterapia é indispensável. A acupuntura e o tuina regulam do fluxo de *qi*, removem agentes e apoiam as funções homeostáticas da Terra. O *QiGong* melhora a respiração (promove *qi defensivum*), promove a circulação de *qi* e remove estases e bloqueios, harmonizando todo o sistema vegetativo.

O que diferencia a dietética da fitoterapia chinesa são as doses e o efeito que delas advém. A ideia base é que doses baixas, como as de Dietética, estimulam as funções das fases, atuando a favor do seu vetor. Por outro lado, altas doses, como as de fitoterapia chinesa, suprimem essas funções atuando, de maneira geral, no sentido contrário da fase (70; 71). Em MTC os fitofármacos descrevem-se de acordo com vários parâmetros, descritos de seguida.

3.9.1

Sapor

Os fitofármacos agrupam-se de acordo com o seu vetor terapêutico, que age no sentido do valor alvo. Este vetor terapêutico é o *sapor* do fitofármaco. O *sapor* é um vetor centrípeto que transmite a característica farmacodinâmica ou dietética de uma planta ou alimento (56; 70; 71).

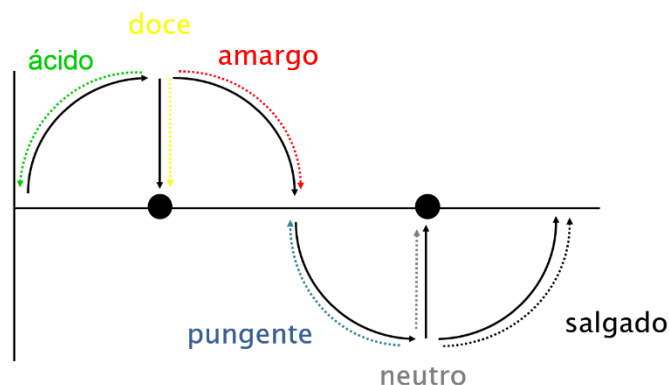


Figura 18 - Representação dos *sapores*. Adaptado de (59; 70)

Cada vetor de diagnóstico tem o correspondente vetor terapêutico:

- Sapor **ácido** - atua contra a fase Madeira (vetor descendente).
- Sapor **amargo** - atua a favor da fase Fogo (vetor descendente).
- Sapor **doce** - atua a favor da fase Terra (orbe Estomacal, vetor descendente).
- Sapor **pungente** - atua contra a fase Metal (vetor ascendente).
- Sapor **salgado** - atua a favor da fase Água (vetor ascendente).
- Sapor **neutro** - atua a favor da fase Terra (orbe Lienal, vetor ascendente).

Embora a palavra *sapor* aponte para o sabor, nem sempre esse sabor está presente no fitofármaco ou alimento. Por essa razão a terminologia não foi utilizada neste modelo. *Sapor* é antes uma característica que se manifesta pela ação vegetativa da planta ou alimento.

Quadro 8 - Descrição dos seis *sapores*. Adaptado de (70).

Sapor	Efeitos
Ácido	Elimina bloqueios, efeito obstipante, ajuda à manutenção de fluidos, efeito adstringente.
Amargo	Efeito descendente, promove a diminuição do ardor e <i>calor</i> , seca
Doce	Fornecer energia, harmonizar todo o sistema corporal, cria fluidos, efeito sedativo e regulador,
Pungente	Leva à libertação de <i>qi</i> e <i>yang</i> , atua na <i>extima</i>
Salgado	Formação de fluidos e sua integração nos tecidos, demulce tecidos gelificados
Neutro	Promove a regulação dos fluídos, promove a eliminação de <i>humor</i>

3.9.2

Relação com a orbe

Os fitofármacos caracterizam-se também pela relação com as orbes:

- Relação direta: se o *sapor* atua nos sintomas da fase correspondente; por exemplo, *sapor ácido* atua na fase Madeira
- Relação indireta: se o *sapor* é muito forte e por isso apresenta efeitos nos sintomas de outras fases; por exemplo, *sapor ácido* atua na fase Metal (70; 71).

3.9.3

Comportamento de temperatura

Um fitofármaco tem a capacidade de atuar sobre a microcirculação, ou seja, sobre o *algor / calor*. Assim sendo, pode-se classificar em: muito frio (arrefece rapidamente), frio (arrefece mas não demasiado rápido), neutro (sem efeito na temperatura), quente (aquece), muito quente (aquece bastante) (70).

Uma planta com uma ação muito quente atua no sistema neurovegetativo promovendo muito a microcirculação. Em contrapartida, uma planta com comportamento frio diminui a microcirculação, arrefecendo (70). Por exemplo, testes com animais demonstraram que algumas plantas com propriedades frias, como é o caso da *radix Scutellariae*, *radix Gentianae* e *cortex Phellodendri*, reduzem a excreção de noradrenalina na urina, ao passo que plantas quentes, como *radix Aconiti Lateralis* ou *cortex Cinnamomi*, promovem o seu

aumento. Esta última planta, assim como o *rhizoma Zingiberis*, aumentam a circulação sanguínea na superfície corporal, evidenciando a sua ação quente (72).

3.9.4

Tendência funcional do fitofármaco

O comportamento de temperatura de um fitofármaco potencia a ação do seu *sapor*, sendo o resultado final denominado tendência funcional do fitofármaco. Ou seja, a tendência funcional de uma planta resulta da soma do seu *sapor* (direção vegetativa no organismo) com o seu comportamento de temperatura (efeito na microcirculação).

- Ação “superficial” - tendência funcional de maior capacidade de elevar/fluir o *qi* (vetor terapêutico ascendente), atua na superfície
- Ação “elevantia” - aumenta o *qi* e a temperatura
- Ação “neutra”
- Ação “depressiva”
- Ação “sedativa” - tendência funcional de maior capacidade para harmonizar o *qi* (vetor terapêutico descendente).

A título de exemplo, fármacos de comportamento de temperatura quente podem causar movimentos terapêuticos ascendentes (ação superficial/elevantia) e fármacos de comportamento de temperatura fria podem causar movimentos terapêuticos descendentes (ação depressiva/sedativa) (70).

Na fitoterapia chinesa a forma de administração é em decocções, em que várias plantas são selecionadas, de acordo com o diagnóstico de MTC, são cozidas durante cerca de 30 minutos e o extrato resultante é administrado por via oral ao paciente. Não se trata de um composto químico mas sim de uma ação multialvo, em que diversos compostos atuam de uma forma sinérgica.

3.9.5

Tratamento do cancro através da fitoterapia chinesa

Os estudos recentes indicam que a MTC pode desempenhar um papel importante em todas as fases de tratamento do cancro, incluindo no pós-operatório e nos ciclos de quimio e radioterapia (51; 73-75). Supressão da progressão tumoral, melhoria das complicações cirúrgicas, diminuição dos efeitos adversos e aumento da sensibilidade à radio e quimioterapia e estimulação do sistema imunitário são algumas das vantagens descritas

para a MTC no tratamento do cancro (51; 73-75). Angiogénese, proliferação, apoptose, metastização, imunorregulação são alguns dos alvos descritos para as plantas utilizadas em fitoterapia chinesa (74; 76).

Os grupos de plantas de MTC que tradicionalmente são utilizadas para o tratamento de cancro são:

- i) Plantas que melhoram a função do *qi* e *xue* (ex: *radix Ginseng*, *radix Astragali*, *radix Codonopsis*);
- ii) Plantas que promovem a circulação de *xue* (e.g., *radix Angelica sinensis*, *Curcuma longa*);
- iii) Plantas com propriedades detoxificantes e que diminuem quadros de *calor* (ex. *Scutellaria barbata*) (51).

No quadro abaixo descrevem-se as atividades biológicas de algumas plantas utilizadas em MTC para o tratamento de cancro.

Quadro 9 - Atividades descritas de algumas plantas utilizadas em MTC para o tratamento de cancro. Adaptado de (51; 73-75).

Nome comum	Atividades biológicas demonstradas
<i>radix Ginseng</i>	Antitumoral, antioxidante, imunomodulador, hepatoprotetor
<i>radix Astragali</i>	Antitumoral, antioxidante, imunomodulador, hepatoprotetor
<i>radix Codonopsis</i>	Antitumoral, antioxidante, imunomodulador, induz apoptose
<i>radix Angelicae sinensis</i>	Antitumoral, imunomodulador/imunoestimulante, neuroprotetor
<i>Curcuma longa</i>	Antitumoral, antioxidante, anti-inflamatório
<i>Scutellaria barbata</i>	Antitumoral, anti-inflamatório

Tal como foi referido acima, a fitoterapia chinesa é normalmente administrada em fórmulas, e raramente na forma de plantas isoladas. A título de exemplo, o quadro abaixo apresenta três fórmulas utilizadas quanto à sua constituição e as atividades biológicas descritas.

Quadro 10 - Atividades descritas de algumas decocções utilizadas em MTC para o tratamento de cancro. Adaptado de (51).

Nome comum	Atividades biológicas demonstradas
<i>tuber Pinellia; Scutellaria baicalensis; rhizoma Zingiberis; fructus Zizyphi; rhizoma Coptidis; radix Glycyrrhiza; Panax ginsen</i>	Antitumoral, Imunomodulação
<i>radix Ginseng; radix Astragali; radix Angelicae; radix Rehmanniae; rhizoma Atractylodis lanceae; cortex Cinnamomi; radix Poria, Paeoniae; rhizoma Ligustici; radix Glycyrrhizae</i>	Antitumoral, Imunomodulação
<i>Scutellaria baicalensis; Paeonia lactiflora; Glycyrrhiza uralensis; Ziziphus jujuba</i>	Antitumoral, Anti-inflamatório

Os constituintes destas fórmulas atuam em vários alvos e em sinergia para potenciar o efeito desejado e diminuir os efeitos adversos. Trata-se portanto de uma abordagem diferente da terapêutica farmacológica ocidental (52; 66; 70; 77). Isto poderá representar uma vantagem tendo em conta que a população celular nos cancros é muito heterogénea, o que justificaria uma ação sobre múltiplos alvos (10). No que diz respeito à terapia anticancerígena, combinar os tratamentos ocidentais com a MTC poderá ter diversos benefícios, como se apresenta na figura abaixo.

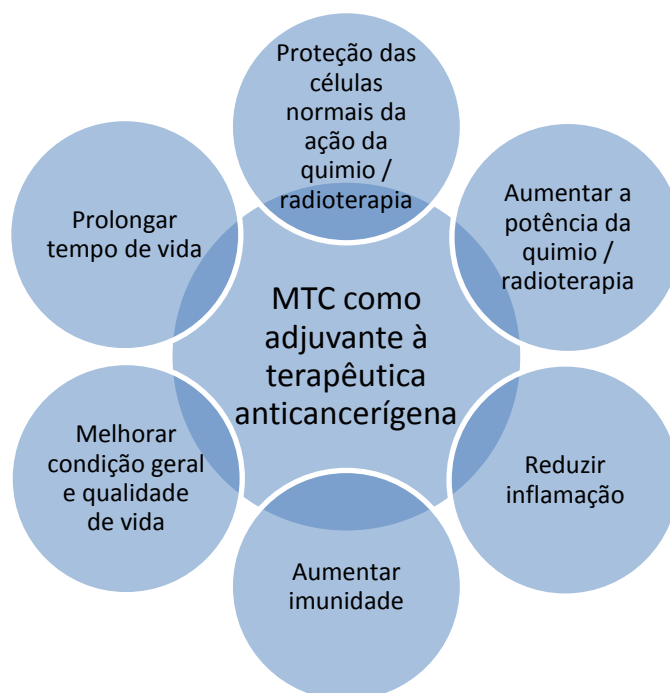


Figura 19 - Objetivos da utilização da fitoterapia chinesa como adjuvante à terapêutica anticancerígena clássica. Adaptado de (75).

4

GENTIANA LUTEA: PERSPETIVA CONVENCIONAL E TRADICIONAL

4.1

METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS CHINESAS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

As plantas medicinais desempenham um papel crucial em medicina desde tempos ancestrais (78). Compreendendo o enorme reservatório de entidades químicas que a Natureza representa, a investigação científica caminhou no sentido do isolamento e elucidação estrutural dessas entidades com o objetivo de avaliar o seu potencial terapêutico. Os produtos naturais são uma importante fonte de medicamentos anticancerígenos, tal como demonstrou um estudo de 2007 que concluiu que 47% dos novos fármacos com ação anticancerígena eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (5). Alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina, vindesina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), podofilotoxina e seus derivados (etoposido, teniposido) e antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina) são alguns exemplos (79).

O interesse da comunidade científica ocidental nas plantas utilizadas em MTC é crescente, sendo estas reconhecidas fontes de novas entidades químicas e de novas estratégias de quimioterapia adjuvante no sentido de aumentar a eficácia dos tratamentos e de reduzir os efeitos adversos da quimioterapia (28; 80). Exemplos de moléculas com atividade anticancerígena isoladas ou desenvolvidas a partir de metabolitos secundários de plantas utilizadas em MTC estão também descritos na literatura (quadro 11).

Quadro 11 - Moléculas com atividade anticancerígena isoladas ou desenvolvidas a partir de metabolitos secundários de plantas utilizadas em MTC. Adaptado de (77; 79; 81).

Princípio ativo	Planta
Artesunato	<i>Artemisia annua</i>
Berberina	<i>Berberis sargentiana</i>
	<i>Berberis vulgaris</i>
	<i>Berberis aristata</i>
	<i>Hydrastis chinensis</i>
	<i>Berberis canadensis</i>
	<i>Coptis aquifolium</i>
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>
Homoarringtonina	espécies de <i>Cephalotaxus</i>

Um exemplo promissor da contribuição da fitoterapia chinesa no tratamento de cancro, já demonstrado através de ensaios clínicos, nomeadamente em leucemia, é a

homoarringtonina, uma molécula encontrada em espécies de *Cephalotaxus*, tal como *C. harrintonia*, *C. hainanensis* e *C. qinensis*. (79).

4.2

GENTIANA LUTEA

Considerando que apenas cerca de 15% de todas as plantas medicinais foram estudadas quanto aos seus constituintes químicos e suas ações, são necessários mais estudos de *screening* de atividades biológicas, nomeadamente anti-tumoral. O presente estudo pretende contribuir para esse conhecimento e por isso a planta estudada nesta tese, a *Gentiana lutea*, foi selecionada tendo em conta a ausência de estudos de *screening* de atividade anti-tumoral.

O género *Gentiana* é o maior da família das Gencianáceas, um grupo com mais de 400 espécies que se distribuem em zonas temperadas da Ásia, Europa e América (78; 82-85); A espécie *G. lutea* é vulgarmente conhecida por genciana (82; 84; 85).

No capítulo seguinte faz-se a descrição da planta de acordo com o conhecimento convencional e tradicional, dando particular ênfase à visão de MTC.



Figura 20 - *Gentiana lutea* (86; 87).

4.2.1

Perspetiva convencional

A espécie *G. lutea* contém constituintes amargos localizados principalmente na raiz, sendo que os mais amargos são do tipo secoiridóide glicosídeo (2 a 8%) (84; 85). Gentiopicrosídeo (A), também conhecido como gentiamarina ou gentiopicrina, é o constituinte mais abundante, que, juntamente com a amarogentina (B), são os constituintes amargos mais importantes (78; 82; 84; 85; 88). Svertiamarina (C) e amarosverina (D) são outros exemplos de substâncias amargas isoladas desta espécie (78).

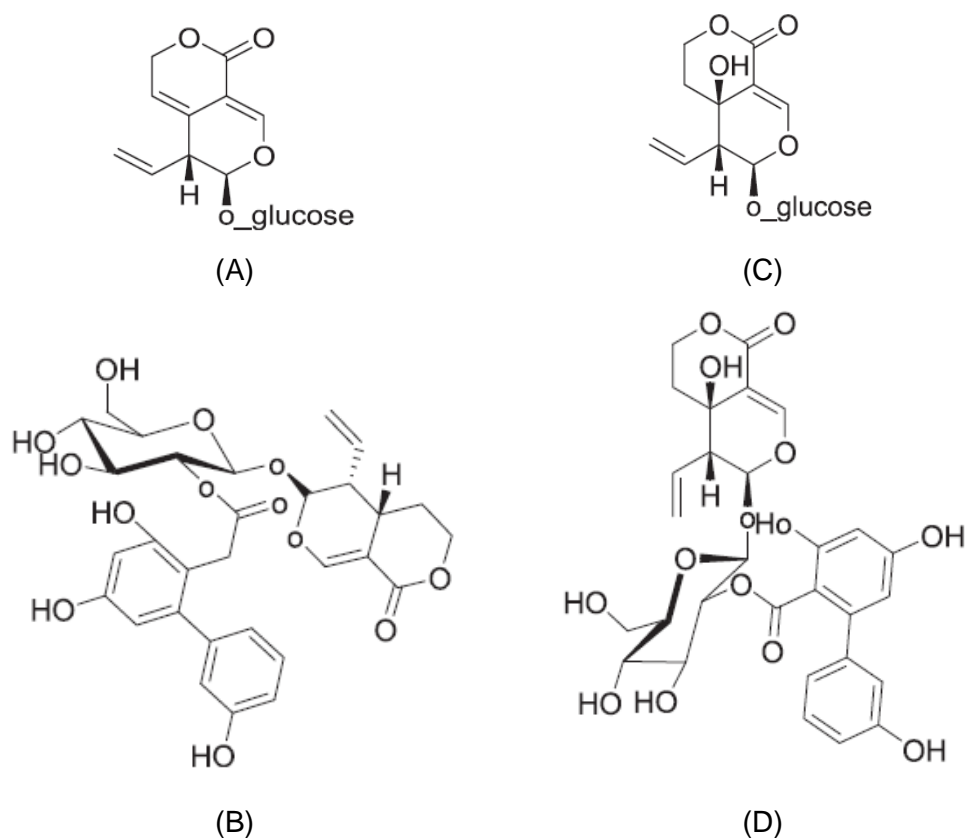


Figura 21 - Compostos isolados de *G. lutea* (78).

Os constituintes amargos estimulam as secreções gástricas e biliares (82; 88; 89). Existem dois mecanismos propostos para a ação de moléculas amargas na função digestiva:

- (1) As moléculas amargas estimulam a ação do nervo vago (parte do sistema parassimpático) nas glândulas salivares e estômago (figura 22).
- (2) As moléculas amargas atuam diretamente sobre mucosa da parte superior do sistema gastrointestinal, especialmente nos recetores de substâncias amargas, aumentando a produção de saliva e sucos gástricos. Esta teoria é apoiada por

estudos recentes que mostram que existem receptores de moléculas amargas e doces no estômago, duodeno, ileum e cólon de ratinhos (78; 84; 85).

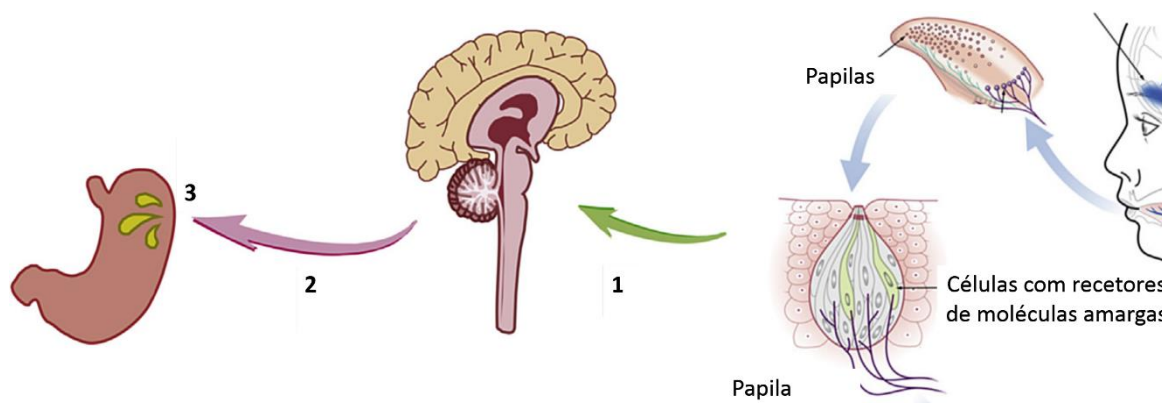


Figura 22 - Ação de substâncias amargas sobre o sistema digestivo.

1: sabor, cheiro ou mesmo pensamentos estimulam o centro hipotalâmico do apetite; 2: ativação do nervo vago pelo sistema parassimpático; 3: estimulação de terminações entéricas e da produção de gastrina. Adaptado de (78; 84; 85).

Neste trabalho testou-se o extrato aquoso e etanólico da raiz de *G. lutea*. A atividade de diferentes extratos desta espécie estão descritos no quadro abaixo.

Quadro 12 - Atividades biológicas descritas de diferentes extratos de *G. lutea*. Adaptado de (90).

Parte da planta	Tipo de extrato	Atividade descrita
<i>G. lutea</i>		
Raiz	Aquoso	Antiproliferativo em RASMCs ¹
Folhas e flores	Metanólico	Antimicrobiano (testado em fungos e bactérias)
Rizoma	Etanólico	Anti-inflamatório
Rizoma	Etanólico	Cicatrizante
Raiz	Etanólico, metanólico	Inibição da aldose redutase
Raiz	Etanólico	Antioxidante
Raiz	Etanólico	Inibição da mieloperoxidase
Raiz e rizoma	Etanólico	Radioprotetor (reduziu o efeito tóxico da exposição a raio-X)
<i>G. lutea ssp. Symphyandra</i>		
Raiz	Etanólico	Colerético
Raiz	Metanólico	Efeitos ao nível do sistema nervoso central

¹ Células do músculo liso da aorta de ratos

Foram já isoladas diversas moléculas do género Gencianáceas, pertencendo à família das xantonas, flavonoides, iridóides, triterpenóides entre outros. De acordo com uma revisão bibliográfica publicada em 2016, os compostos isolados desta espécie com atividades biológicas descritas são:

Quadro 13 - Compostos isolados da espécie *G. lutea* e atividades biológicas descritas.
F – folhas; R – raiz. Adaptado de (84; 85; 90).

Composto	Classe química	Atividade biológica descrita
Gentiopicrosideo (R)	iridóide	Antibacteriano Antifúngico Inibidor da mieloperoxidase Relaxante do músculo liso Anti-inflamatório Hepatoprotetor Gastroprotetor
Amarogentina (R)	iridóide	Gastroprotetor Inibidor da mieloperoxidase
Svertiamarina (R)	iridóide	Gastroprotetor Hepatoprotetor Anti-inflamatório
Amarosverina (R)	iridóide	Gastroprotetor
Gentiolactona (R)	iridóide	Anti-fúngico (sem atividade)
Gentisina	iridóide	Inibidor da proliferação de células do músculo liso vascular
Isogentisina (F)	xantona	Antibacteriano Antifúngico
Gentiopicrina	xantona	Antibacteriano
Mangiferina (F)	xantona	Antibacteriano Antifúngico Radioprotetora Anticolinesterase Citotóxica (não citotóxico acima de 40 µM)
Isoorientina 4'-O-β-D-glucopiranosideo (F)	flanovóide	Radioprotetora
Isovitexina (F)	flanovóide	Antiproliferativo

Quadro 13 - Compostos isolados da espécie *G. lutea* e atividades biológicas descritas.
F – folhas; R – raiz. Adaptado de (84; 85; 90).(com.

Composto	Classe química	Atividade biológica descrita
(2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-{5'- [3-(2-hidroxifenil)-3-oxopropil]- 2',6-bis[(3-metilbut-2-en-1-il)oxy]bifenil-3-il)-prop-2-en-1-ona (R)	flanovóide	Antidepressivo
5-hidroxi flavanona (R)	flanovóide	Antidepressivo
α -Amirina (R)	ursano	Citotóxico (IC50>100 mM)
3-(1,1-Dimetilprop-2-en-1-il)-2-metoxi-6H-dibenzo[b,d]pirano-6-ona (C)	benzopirona	Antidepressivo

4.2.2

Uso tradicional

Tanto na fitoterapia ocidental como na fitoterapia chinesa é utilizada a raiz da *G. lutea* com finalidades terapêuticas.

Os constituintes amargos estimulam as secreções gástricas e biliares sendo que o uso de tónicos amargos na falta de apetite e má digestão é uma prática ancestral (82; 84; 85; 88; 89). Conforme descrito anteriormente, esta planta tem uma ação tónica do estômago atuando diretamente sobre a mucosa gástrica, estimulando a libertação de gastrina e dos sucos gástricos. Aumenta a produção de saliva e bÍlis (colerético) e por isso promove a função digestiva (82; 84; 85; 88; 89). Por não conter taninos, a *G. lutea* não tem efeitos adstringentes e irritantes do estômago. É utilizada em falta de apetite, flatulência, alterações biliares, problemas digestivos e enfartamento, sendo considerada gastroprotetora (82; 84; 85; 88; 89). Adicionalmente, tem propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e imunoestimulantes (82).

De acordo com a monografia realizada pelo Comité para os Medicamentos à Base de Plantas da Agência Europeia do Medicamento, a *G. lutea* tem utilização tradicional aprovada quando utilizada isoladamente ou em combinação com outras plantas amargas e/ou aromáticas para o tratamento de dispepsia/alterações gastrointestinais, alterações coleréticas e perda de apetite (84; 85).

Para a MTC, a raiz de genciana tem um sabor amargo, atua na orbe hepática, felleal e estomacal. No que diz respeito ao comportamento de temperatura é uma planta fria, ou

seja, diminui a ação do *xue* (i.e. reduzem a microcirculação). Faz parte de um grupo de plantas, denominado “*Refrigerantia et Torrefacientia*”, caracterizado pela sua forte ação fria, o que reduz o *calor*/ardor, e pelo efeito na eliminação de *humor*. Por outro lado, sendo uma planta amarga, a *G. lutea* tem também uma ação descendente, diminuindo o *calor* /ardor.

Indicações clínicas gerais para a raiz de genciana em MTC incluem icterícia, estados febris, disúria, conjuntivite, inflamações da vulva e quistos de Bartholin (70; 72; 91).

4.2.3

Analogias entre as duas visões

Os efeitos de aumento da produção de saliva, sucos gástricos e bÍlis e promoção da função digestiva estão em consonância com a visão em MTC pois o *sapor* amargo suporta o vetor descendente da orbe estomacal e, para além disso, atua diretamente nas orbes hepática, felleal e estomacal (figura 23), sendo particularmente útil em desequilíbrios Madeira-Terra. Tal facto justifica a utilização da *G. lutea* em perturbações do sistema digestivo.

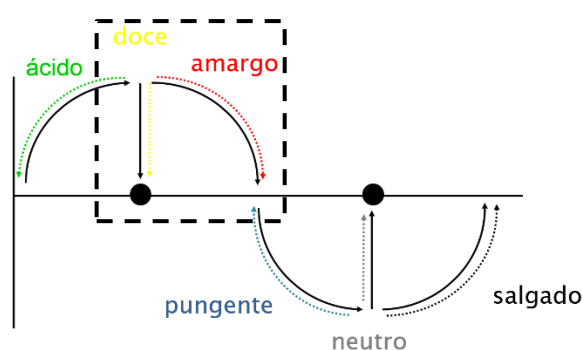


Figura 23 - Curva sinusoidal com representação dos sabores. Adaptado de (70).

A ação anti-inflamatória justifica-se pela própria ação no *xue*, reduzindo a microcirculação e pela ação na eliminação de *humor* (edema), que pode ser vista como a eliminação dos produtos resultantes das reações inflamatórias. Inclusivamente, os fármacos anti-inflamatórios são considerados amargos e de natureza fria.

Adicionalmente, o efeito antidepressivo remete para ação do *sapor* amargo na harmonização do *shen*. Para além disso, o grupo de plantas acima mencionado (“*Refrigerantia et Torrefacientia*”) é classicamente utilizado em infeções, o que está em harmonia com a ação antimicrobiana referida no capítulo anterior.

4.2.4

Atividade anticancerígena de outras plantas amargas e frias

O efeito anti-inflamatório referido no capítulo anterior tem um interesse adicional. Está documentada a relação entre o cancro e a inflamação, conforme se descreve no capítulo 2.1.2. Sendo assim, plantas de *sapor* amargo e de características frias, i.e., de características anti-inflamatórias, podem ser potenciais agentes no combate da doença cancerígena.

Um exemplo de uma planta amarga utilizada em MTC, pertencendo também ao grupo da genciana e com extensa atividade anticancerígena, é a raiz de scutelária (28; 92; 93). Os seus compostos bioativos mais importantes (baicalina, baicaleína, wogonina) têm fortes propriedades anticancerígenas e imunomoduladoras (28; 92; 93). Estes flavonóides têm um efeito citostático e citotóxico em várias linhas celulares tumorais e inibem o crescimento tumoral *in vitro*, uma ação assente em diversos mecanismos, entre os quais (28):

- Ação antioxidante
- Diminuição da atividade do NF-kB
- Diminuição da expressão de NOS e da produção de NO
- Diminuição da expressão de genes importantes para o ciclo celular
- Indução da apoptose
- Diminuição da expressão dos genes da COX-2 e da produção de PGE2
- Prevenção de prevenir infeções virais

Os resultados promissores da ação anticancerígena *in vitro* e *in vivo*, aliados à diminuta toxicidade em células sanguíneas e mieloides permitiram a implementação de ensaios clínicos de fase 1 com o extrato aquoso de *Scutellaria barbata* (Bezielle®), tendo este demonstrado um perfil de toxicidade favorável à realização de mais estudos (28; 92; 94).

Outra planta do grupo “*Refrigerantia et Torrefacientia*” é o *rhizoma coptidis*, da qual foi isolada a berberina (25). Este alcaloide tem um amplo espectro de utilizações clínicas onde se inclui a sua forte atividade anti-inflamatória e anticancerígena (25).

5

MATERIAIS E MÉTODOS

As linhas celulares são células que têm a capacidade de se multiplicarem por longos períodos de tempo e por isso podem ser mantidas em culturas celulares. Uma cultura celular é a manutenção *in vitro* de células de forma desagregada e, enquanto modelo de estudo, as culturas celulares são amplamente utilizados na determinação da atividade citotóxica de compostos naturais ou sintéticos ou extratos de produtos naturais (95-97).

Os testes de citotoxicidade têm como objetivo averiguar se um extrato ou composto apresenta algum efeito tóxico sobre as células em estudo sendo particularmente importantes no desenvolvimento de novos fármacos. Por outro lado, estes estudos *in vitro* são uma etapa preliminar importante antes de se passar para estudos *in vivo* mais complexos. Existem diversos testes que avaliam o efeito de citotoxicidade, alguns marcam a integridade da membrana celular, como é o caso do azul tripano, outros avaliam componentes metabólicos essenciais para a função celular, como é o caso do MTT, outros ainda avaliam as alterações morfológicas das células (98).

Neste trabalho utilizaram-se as linhas celulares MCF-7 (adenocarcinoma humano da mama) e HeLa (carcinoma epitelial do colo do útero) e recorreu-se ao teste colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2-tetrazólio) para estudar a ação citotóxica dos extratos etanólico e aquoso de *G. lutea*. Este teste avalia a viabilidade celular e é considerado um teste de referência que permite obter resultados fiáveis e reprodutíveis (99).

Resumidamente, o desenho do estudo foi o seguinte:

- Planta
 - 1 planta (*Gentiana lutea*)
 - 2 tipos de extração (aquosa por decocção e etanólica por maceração)
- Linhas celulares
 - 2 linhas celulares (MCF-7 e HeLa)
 - 2 concentrações celulares (10^4 e 10^5 células por poço)
- Tempos de leitura
 - 0, 24, 48 e 72 horas

5.1

REAGENTES

Os seguintes produtos foram adquiridos à Sigma-Aldrich, tendo as características exigidas para uso em culturas celulares:

- Meio de cultura para linhas celulares EMEM (Minimum Essential Medium Eagle)
- Soro Bovino Fetal (FBS)
- L-Glutamina
- Solução de Aminoácidos não essenciais
- Sal de Sulfato de gentamicina
- Solução salina tamponada de fosfato (PBS)
- Tripsina-EDTA (0,25%)
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)
- Dimetil-sulfóxido (DMSO)

Os reagentes analíticos isopropanol e etanol a 70% foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O azul tripano foi adquirido à Merk KGaA.

De acordo com as instruções do fabricante, o meio e cultura completo foi preparado adicionando EMEM, 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 2 mM de glutamina. Adicionou-se também 50 mg/l de gentamicina. A solução de gentamicina foi preparada dissolvendo os sais de sulfato de gentamicina em água destilada esterilizada e foi feita uma filtração com filtro de 0,20 µm. A solução-mãe de 5 mg/ml de MTT foi preparada com PBS e foi filtrada com filtro de 0,20 µm. O azul tripano foi solubilizado em água destilada para obter uma solução a 0,4%.

5.2

PLANTA E EXTRATOS

A raiz seca de *Gentiana lutea* foi adquirida à farmácia Alemã Magnolien Apotheke.



Figura 24 - Raiz de *Gentiana lutea*.

Prepararam-se dois extratos: um extrato etanólico e um extrato aquoso conforme o fluxograma da figura 27.

5.2.1

Extrato etanólico

O extrato etanólico foi obtido por maceração, à temperatura ambiente, durante 5 dias e com agitação, numa proporção de 1:5 (125 g de raiz de genciana com 625 ml de etanol a 70%). Ao fim de 5 dias filtrou-se com papel e centrifugou-se durante 1 hora a 15000 rpm para descartar as partículas em suspensão. A solução resultante deste processo foi concentrada até à secura por rotavapor obtendo-se 40,42 g de extrato bruto.



Figura 25 - Extrato etanólico bruto.

Para a preparação de uma solução-mãe de 500 mg/ml recolheu-se uma amostra do extrato e dissolveu-se em DMSO. A partir desta solução preparou-se uma solução de 50 mg/ml, através de uma diluição de 1:10 com meio de cultura, que foi filtrada com filtro de 0,20 µm. A partir desta solução prepararam-se as concentrações teste por sucessivas diluições com meio completo. A concentração final de DMSO nos poços foi de 0,1% para evitar concentrações citotóxicas (100).

5.2.2

Extrato aquoso

Para o extrato aquoso demolhou-se a raiz da genciana durante 30 minutos após os quais se levou a água a ebulição durante 30 minutos. Ao final desse tempo filtrou-se com papel e centrifugou-se durante 1 hora a 15000 rpm (rotações por minuto) para descartar as

partículas em suspensão. A solução resultante deste processo foi concentrada até à secura por rotavapor obtendo-se 35,26 g de extrato bruto.

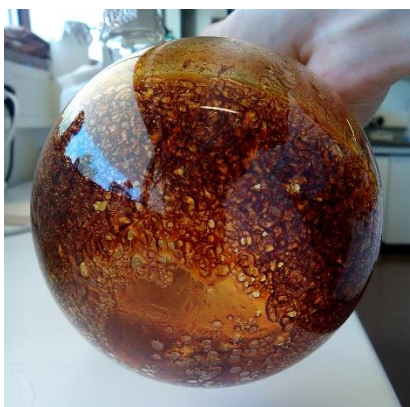


Figura 26 - Extrato aquoso bruto.

Para a preparação de uma solução-mãe de 500 mg/ml recolheu-se uma amostra do extrato e dissolveu-se em água destilada. A partir desta solução preparou-se uma solução de 50 mg/ml, através de uma diluição de 1:10 com meio de cultura completo, que foi filtrada com filtro de 0,20 μm . As soluções a testar foram preparadas através de diluições em meio de cultura completo.

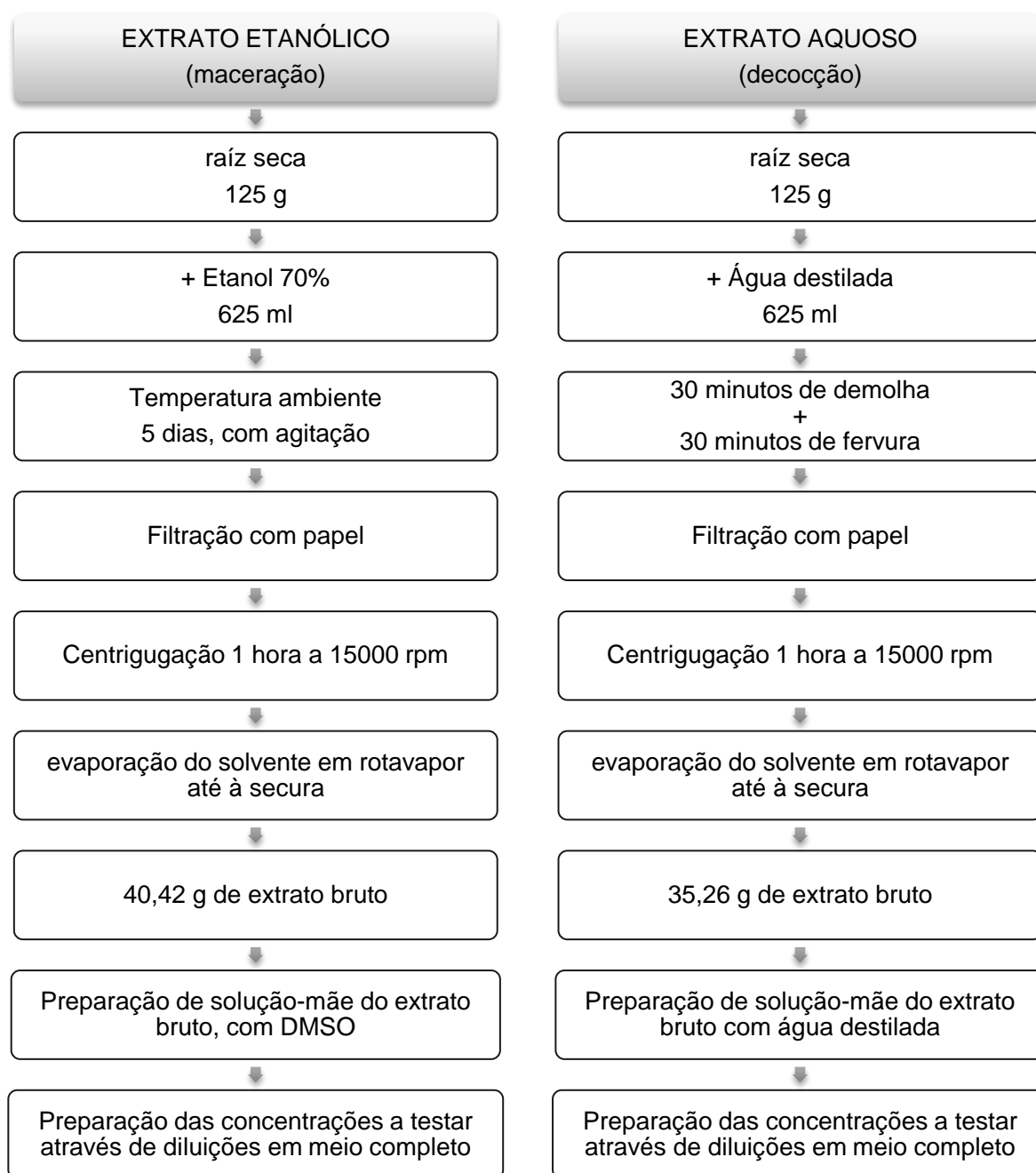


Figura 27 - Fluxograma de preparação dos extratos e concentrações a testar.

5.3

Manutenção da cultura celular

A cultura de células animais é baseada na manutenção *in vitro* de células desagregadas e pode ter uma origem não neoplásica ou neoplásica. Nas linhas celulares de origem neoplásica são retiradas células de tumores e são colocadas a crescer em condições apropriadas para assegurar a sua multiplicação. As linhas celulares podem ser mantidas durante muitas passagens desde que sejam expandidas quando atingem uma determinada

confluência. Esta característica permite a sua utilização em ensaios experimentais (96; 101).

Foram utilizadas duas linhas celulares, MCF-7 (adenocarcinoma humano da mama, caucasiano) e HeLa (carcinoma epitelial do colo do útero), adquiridas à Sigma-Aldrich (Alemanha). Ambas as linhas celulares foram mantidas em culturas de monocamada com EMEM, suplementado com 10% de FBS, 2 mM de glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais, de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi também suplementado com 50 mg/L de gentamicina. As culturas celulares foram mantidas em frascos T75 numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e o meio era mudado a cada 2-3 dias, conforme a morfologia e confluência celular. Ao atingir 70-80% de confluência, ou seja quando as células ocupavam 70 a 80% da superfície total do frasco, foi efetuada uma passagem das células para novas subculturas por tripsinização. Para tal removia-se o meio de cultura, lavavam-se as células duas vezes com PBS e adicionava-se a solução de tripsina. A tripsina permanecia em contacto com a linha celular HeLa durante 3 minutos e com a linha celular MCF-7, mais aderente, durante 5 minutos. Após este tempo adicionava-se meio completo para inativação da tripsina e centrifugava-se a suspensão celular durante 3 minutos a 1500 rpm. O *pellet* de células era ressuspendido em meio completo e as células eram contadas por azul tripano em câmara de Neubauer. A nova inoculação era feita a $1,3 \times 10^4/\text{cm}^2$ para HeLa e a $2,4 \times 10^4/\text{cm}^2$ para MCF-7.

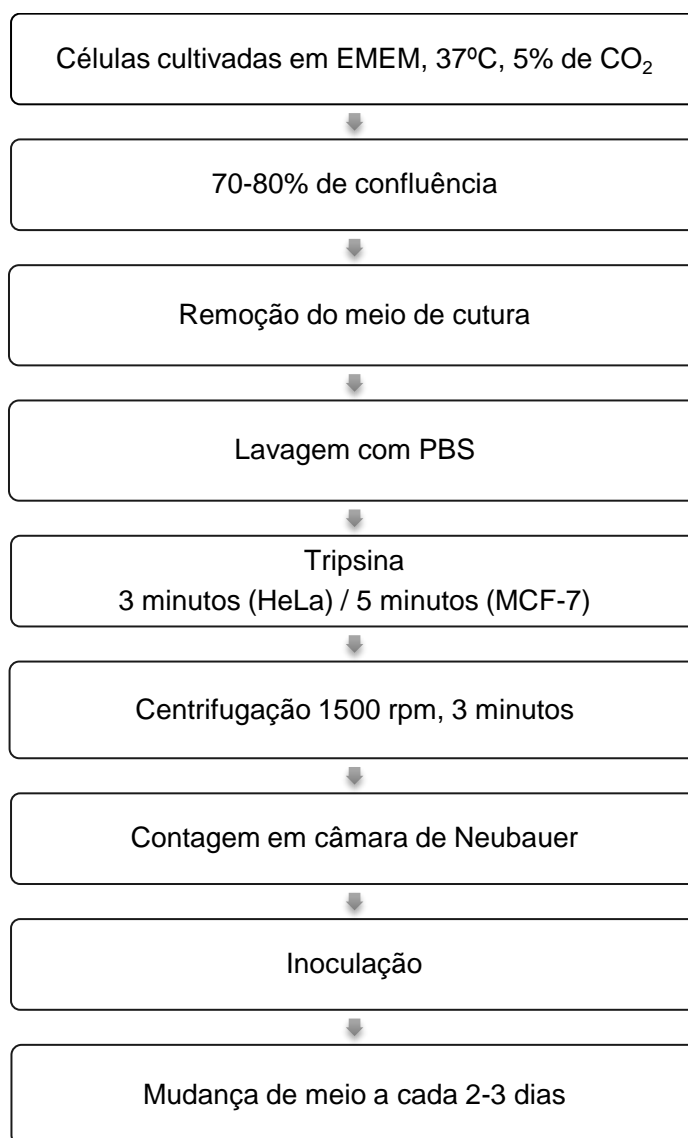


Figura 28 - Fluxograma manutenção da cultura celular.

5.5

Curva de crescimento das linhas celulares

De uma forma geral as linhas celulares crescem *in vitro* de acordo com uma curva com perfil sigmoidal, que pode ser dividida em 4 fases:

- A. Fase lag - tem a duração entre algumas horas a 48 horas, o tempo para que as células recuperem da tripsinização e se adaptem às condições de cultura; reduzida divisão celular.
- B. Fase de crescimento logarítmico - período de crescimento, frequentemente exponencial, em que a população duplica a um tempo característico para cada linha celular (tempo de duplicação). Os testes de atividade biológica devem ser feitos durante esta fase.

- C. Fase estacionária ou plateau - período no qual a confluência já está alta, levando à redução da velocidade de replicação celular.
- D. Fase de declínio - período onde predomina a morte celular (96; 101; 102)

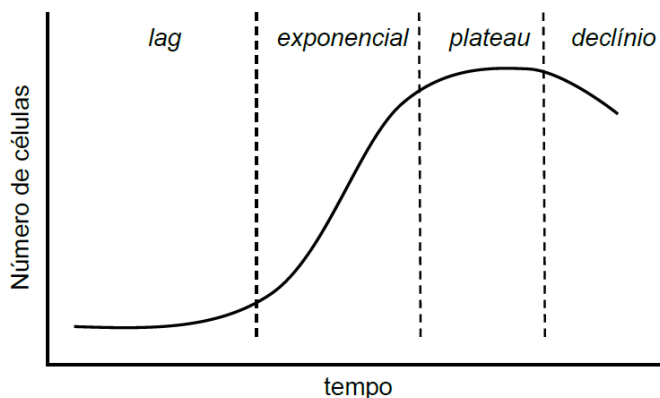


Figura 29 - Perfil de crescimento celular para uma linha celular cultivada *in vitro*. Adaptado de (96; 101)

As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ durante um período de 1 a 4 dias. Uma análise pelo método colorimétrico com MTT foi realizada a cada ciclo de 24 h de incubação, conforme se descreve no ponto 5.6.

5.6

Teste MTT

Este teste colorimétrico baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células vivas converterem o pigmento amarelo de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2-tetrazólio (MTT), solúvel em água, num pigmento azul escuro (formazan), insolúvel em água.

Uma vez que na maior parte das células viáveis a atividade mitocondrial é constante, um aumento ou diminuição no número de células viáveis é diretamente proporcional à atividade mitocondrial. Assim sendo, a variação do número de células viáveis resulta numa variação diretamente proporcional à variação da quantidade de sais de formazan, que é determinada pela sua densidade ótica. Esta correlação faz do teste de MTT um ensaio quantitativo, de confiança, e com elevada reprodutibilidade. É vastamente utilizado em ensaios *in vitro* para a determinação do efeito de compostos ou extratos na viabilidade celular (98; 99; 103).

Como os cristais de formazan formados são armazenados em vesículas lipídicas no citoplasma da célula, é necessário adicionar um agente solubilizante para romper a membrana celular e solubilizar os cristais. A absorvância da solução resultante é determinada a 570 nm, comprimento de onda no qual o formazan tem um pico de absorvância com subtração da absorvância no comprimento de onda de referência (655 nm) (98; 100; 103; 104).

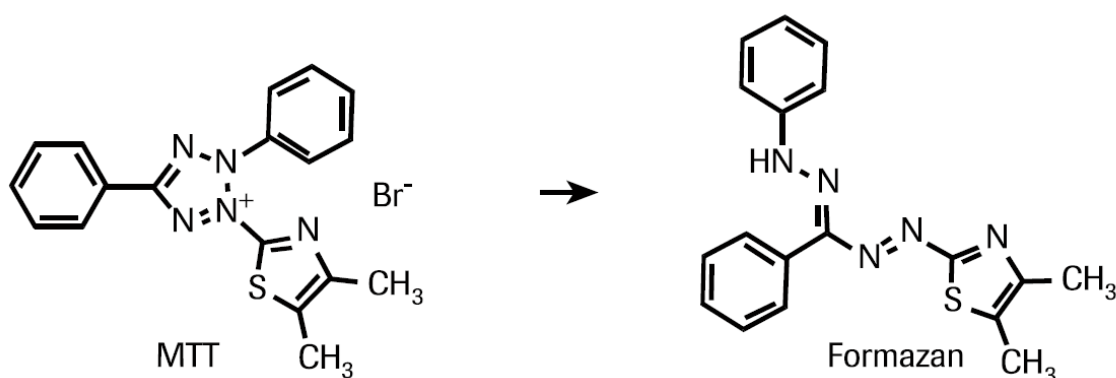


Figura 30 - Metabolização mitocondrial do MTT a formazan em células viáveis.

Adaptado de (29; 99).

Para a construção da curva de crescimento, inoculou-se placas de 96 poços com 10^3 células/poço, $2,5 \times 10^3$ células/poço, 10^4 células/poço, 5×10^4 células/poço e 10^5 células/poço. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ durante um período de 1 a 4 dias. Às 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas foi adicionado 10 µl MTT para uma concentração final do poço de 0,5 mg/ml, e incubou-se em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 2 horas. Findo esse tempo aspirou-se cuidadosamente o meio, adicionou-se 100 µl isopropanol e incubou-se durante 30 minutos, no escuro e com leve agitação. A leitura dos resultados foi feita em leitor de placa de ELISA a 570 nm e a 655 nm (100; 104). Para cada concentração foram realizadas 3 réplicas.

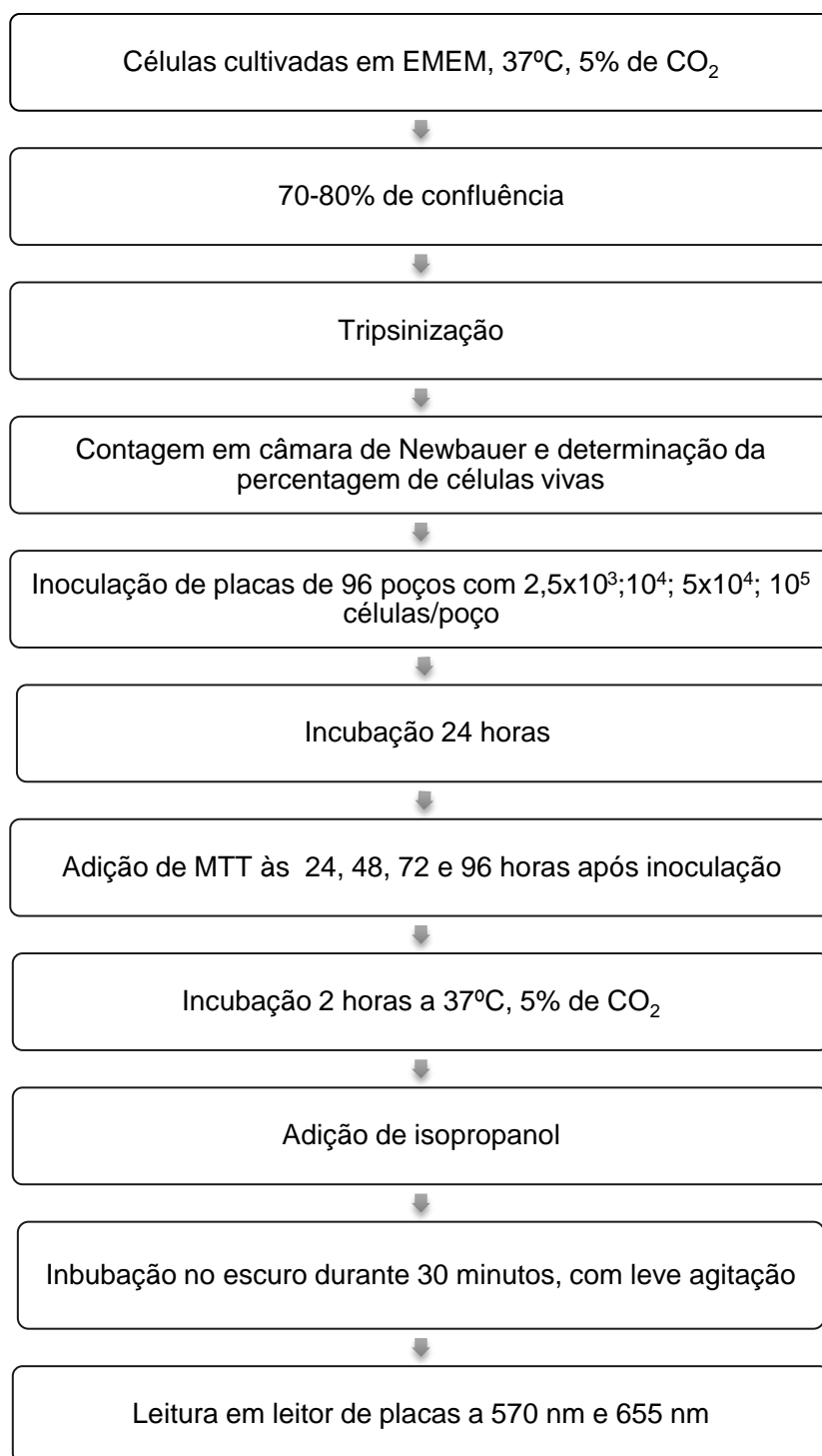


Figura 31 - Fluxograma do teste de MTT para construção da curva de crescimento.

Para o teste dos extratos, placas de 96 poços foram inoculadas com 10⁴ e 10⁵ células de ambas as linhas celulares. Após 24 horas da inoculação foram adicionadas concentrações crescentes dos extratos de forma a obterem-se as seguintes concentrações nos poços: 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml. Foi também feito um controlo com a concentração final de DMSO de 0,1%. Após 0, 24, 48 e 72 horas foi adicionado 10 µl MTT para uma concentração final do poço de 0,5 mg/ml, e incubou-se em atmosfera

de 5% de CO₂ a 37°C durante 2 horas. Findo esse tempo aspirou-se cuidadosamente o meio, adicionou-se 100 µl isopropanol e incubou-se durante 30 minutos, no escuro e com leve agitação. A leitura dos resultados foi feita em leitor de placa de ELISA a 570 nm e a 655 nm (100; 104). O teste foi feito em quadruplicado.

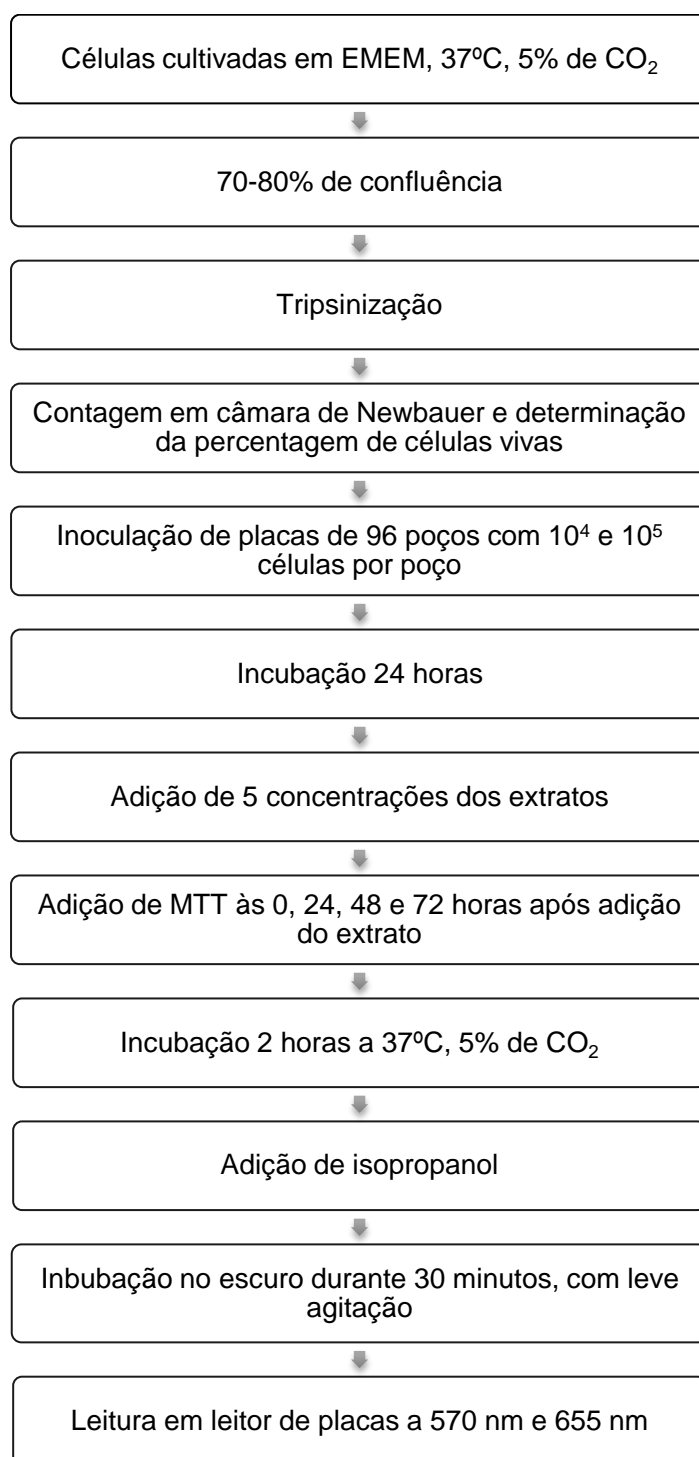


Figura 32 - Fluxograma do teste de MTT para avaliação do extratos de *Gentiana lutea*.

6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho pretendeu fazer um estudo preliminar da citotoxicidade induzida pelo extrato aquoso, obtido por decocção, e pelo extrato etanólico, obtido por maceração, da raiz de *Gentiana lutea*. Esta atividade foi determinada após 0, 24, 48 e 72 horas de exposição ao extrato, através da avaliação da viabilidade celular pelos ensaios de redução do MTT. Os ensaios foram realizados conforme se indica de seguida:

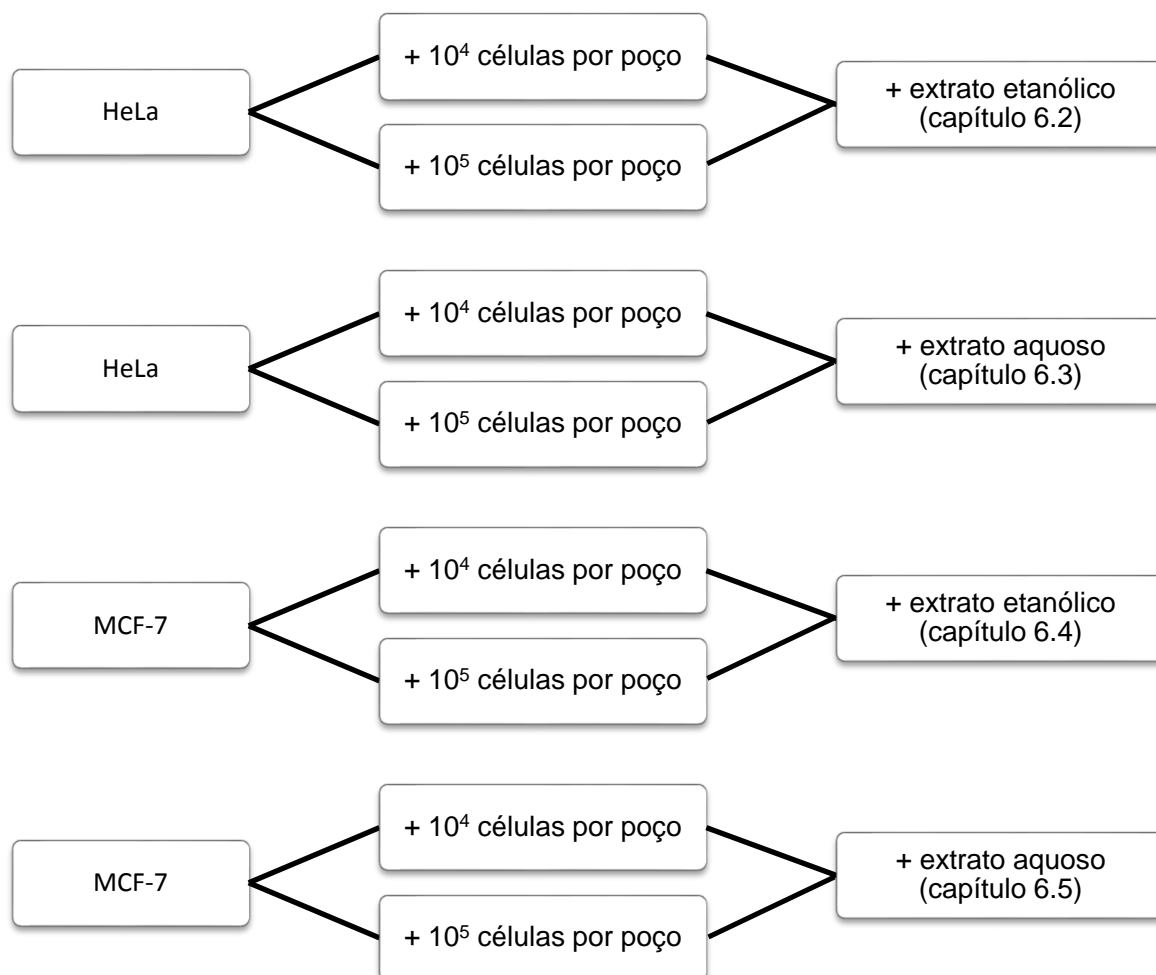


Figura 33 - Desenho do estudo

Os dados obtidos nestes ensaios são apresentados na forma de dois gráficos: viabilidade em função do tempo e viabilidade em função da concentração. Os valores de viabilidade foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs teste} / \text{Abs controlo}) \times 100$$

“Abs teste” representa a absorvância a 570 nm corrigida pela absorvância a 655 nm de culturas expostas ao extrato em estudo e a “Abs controlo” representa a absorvância a 570 nm corrigida pela absorvância a 655 nm das culturas celulares de controlo. Cada valor de

absorvância apresentado é a média dos valores obtidos em quatro culturas diferentes (quaduplicados), iniciadas e processadas em paralelo.

A figura abaixo mostra a visão microscópica de HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , após a incubação com MTT. Os precipitados visíveis (sais de formazan) foram então solubilizados com isopropanol para posterior leitura das absorvâncias.

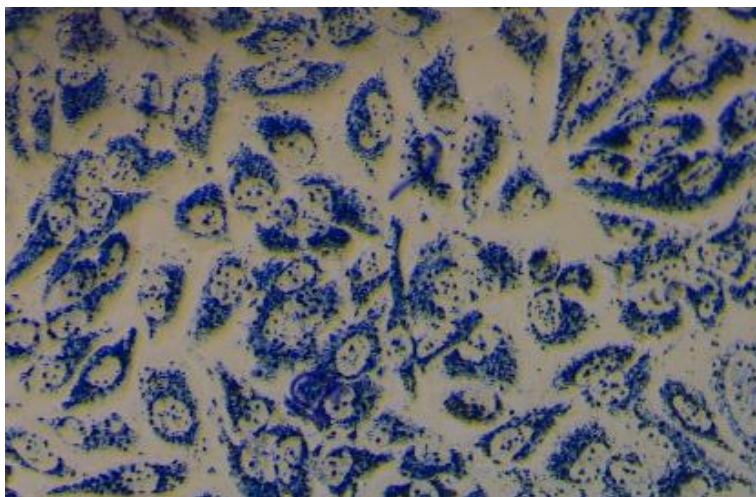


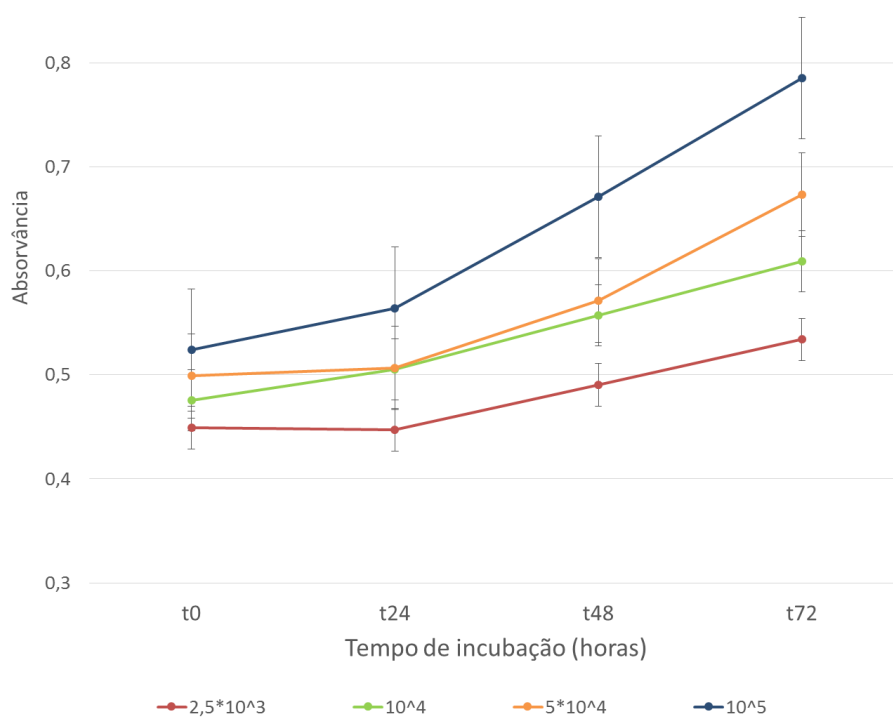
Figura 34 - Sais de formazan em HeLa.

6.1

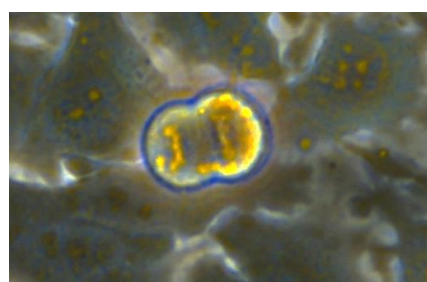
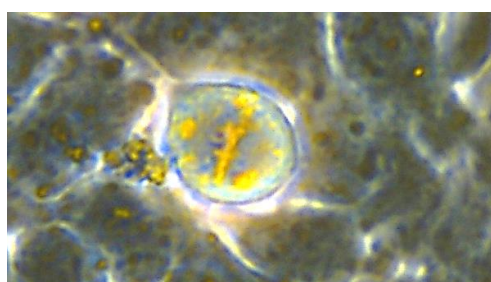
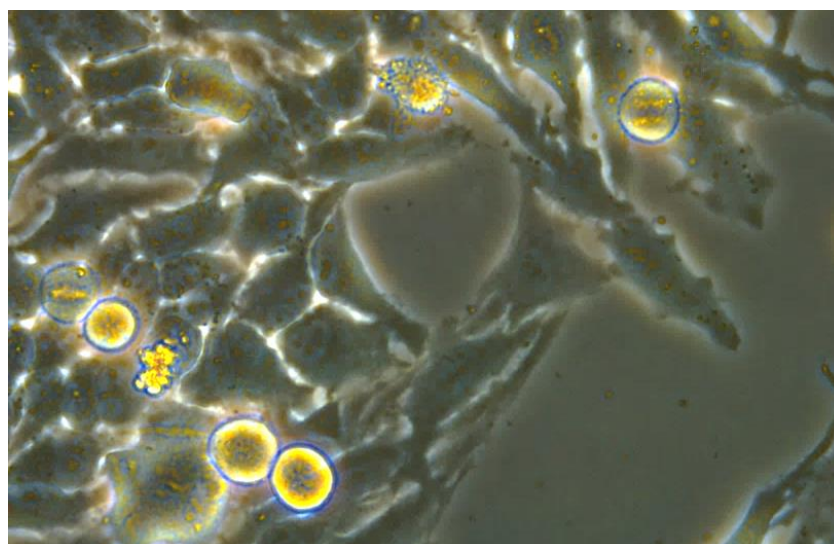
Curvas de crescimento

O gráfico 1 representa a curva de crescimento de HeLa, a várias concentrações celulares por poço (ensaio realizado em microplaca de 96 poços). Pelas curvas de crescimento apresentadas optou-se pela utilização das concentrações celulares de 10^4 e 10^5 por poço para a realização deste estudo.

Gráfico 1 - Curvas de crescimento de HeLa, a várias concentrações celulares por poço.



A figura abaixo mostra uma visão microscópica de uma cultura celular aderente de HeLa, em frasco T75, com o pormenor de células em divisão.



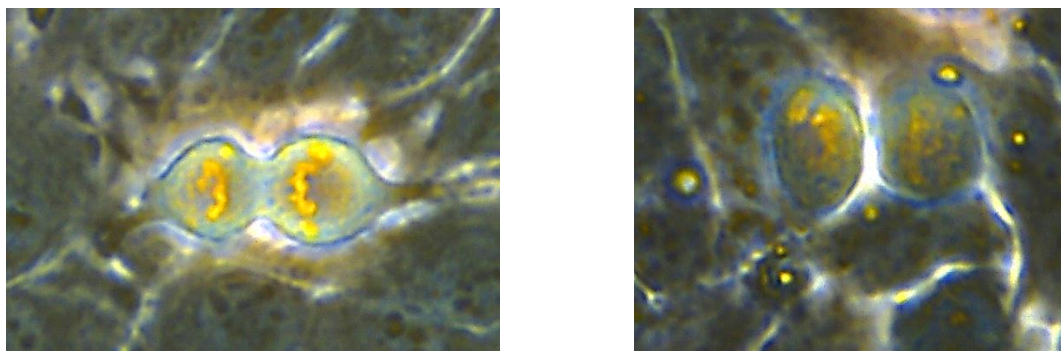
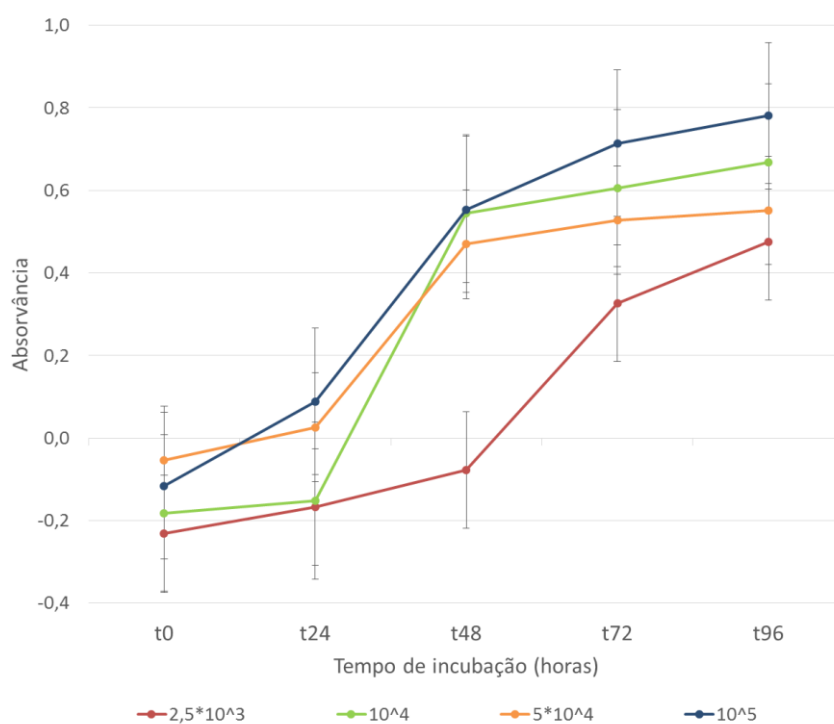


Figura 35 - HeLa em crescimento em frasco T75, com detalhe de divisão celular.

O gráfico 2 representa a curva de crescimento de MCF-7, a várias concentrações celulares por poço. A curva de crescimento obtida indica que as concentrações celulares de 10^4 e 10^5 seriam adequadas para a realização deste estudo.

Gráfico 2 - Curvas de crescimento de MCF-7, a várias concentrações celulares por poço.



A figura abaixo mostra uma visão microscópica de uma cultura celular aderente de MCF-7, em frasco T75, com o pormenor de células em divisão.

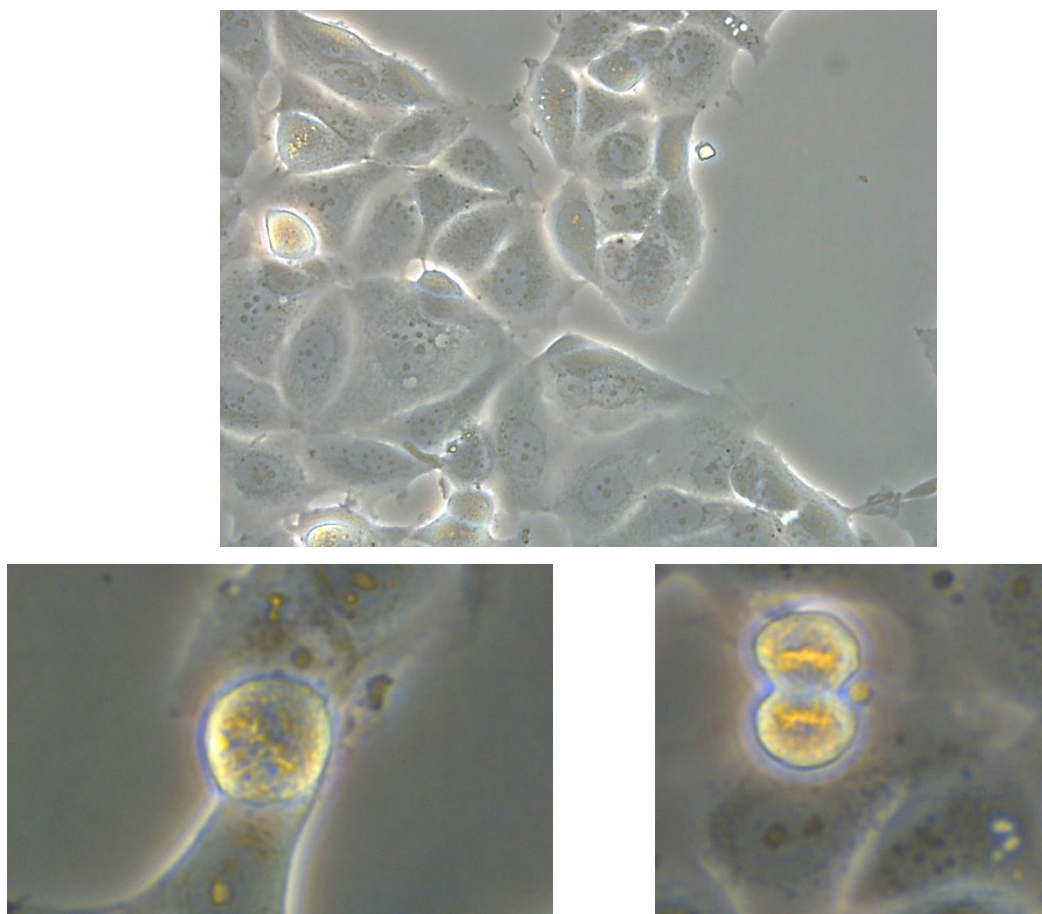


Figura 36 - MCF-7 em crescimento em frasco T75, com detalhe de divisão celular.

6.2

Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico em HeLa

Os dois gráficos abaixo representam a evolução da viabilidade em função do tempo de duas concentrações celulares da linha HeLa quando exposta ao extrato etanólico de *G. lutea*. Os gráficos mostram um aumento da viabilidade às 24 e 48 horas. Adicionalmente, às 72 horas há uma marcada diminuição da viabilidade. Estes efeitos são semelhantes para todas as concentrações de extrato observando-se, para a concentração celular de 10^4 , um efeito proliferativo superior na presença da concentração mais baixa de extrato e um efeito citotóxico superior para a concentração mais alta de extrato. Nos poços com 10^5 células o efeito citotóxico mais acentuado verificou-se para a concentração mais alta de extrato.

A concentração de 0,1% de DMSO não mostrou aparentemente influenciar o crescimento celular (dados não apresentados).

Gráfico 3 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de *G. lutea*.

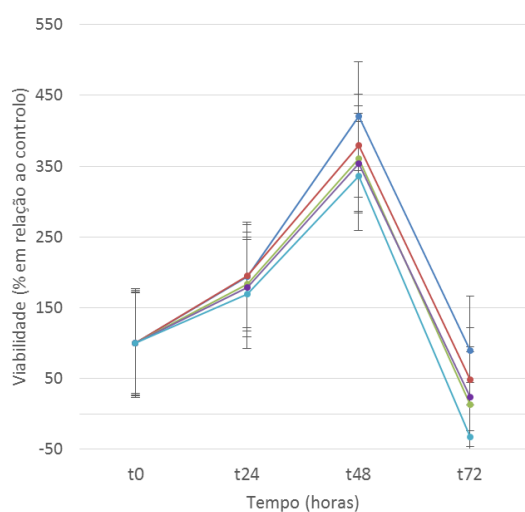
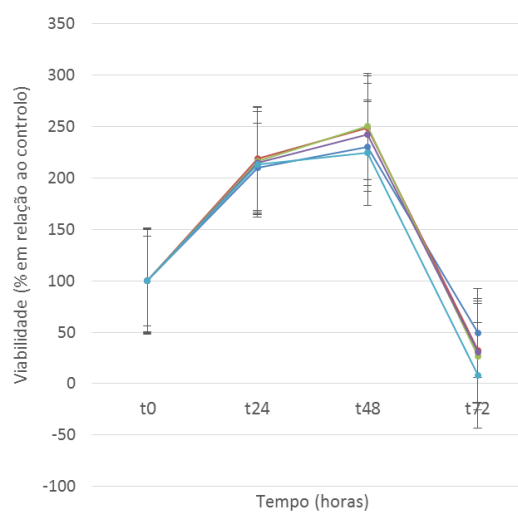


Gráfico 4 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de *G. lutea*.



—●— 31,25µg/ml —●— 62,5µg/ml —●— 125µg/ml —●— 250µg/ml —●— 500µg/ml

De acordo com os gráficos 5 e 6, as várias concentrações testadas não fazem variar de uma forma expressiva a viabilidade às 24 e 48 horas. Às 72 horas é notória a diminuição da viabilidade para todas as concentrações de extrato, sendo mais pronunciada na concentração de extrato mais alta. Para ambas as concentrações celulares o aumento da viabilidade é mais marcado às 48 horas e às 72 horas o efeito citotóxico é mais pronunciado. Pelos gráficos obtidos estima-se que a concentração que causa 50% de diminuição da viabilidade celular (IC50) é aproximadamente 62,5 µg/ml para a concentração celular de 10^4 , e de 31,25 µg/ml para a concentração celular de 10^5 , efeito visível às 72 horas. Assim sendo, o tempo de exposição e a concentração celular parecem ser determinantes para o efeito citotóxico.

Gráfico 5 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato etanólico de *G. lutea*.

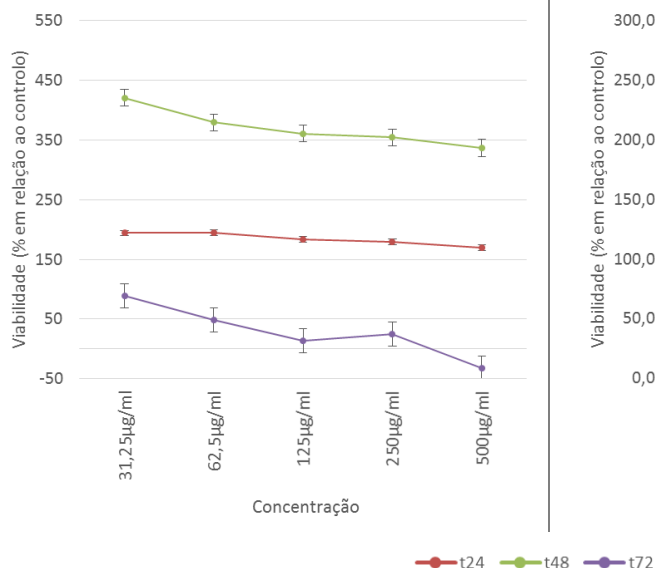
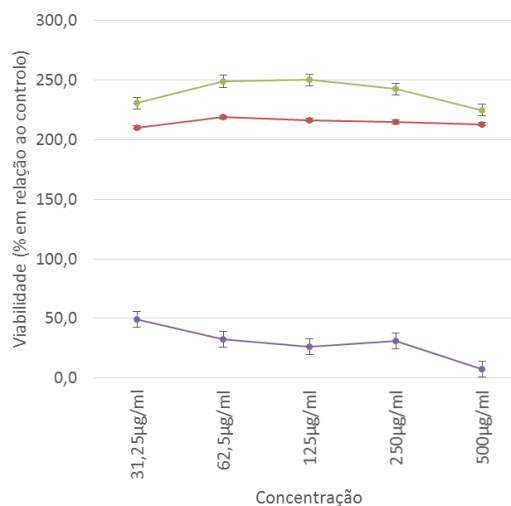


Gráfico 6 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de extrato etanólico de *G. lutea*.



6.3

Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso em HeLa

Os dois gráficos abaixo representam a evolução da viabilidade em função do tempo de duas concentrações celulares da linha HeLa quando exposta ao extrato aquoso de *G. lutea*. Os gráficos mostram uma diminuição da viabilidade às 24 horas para ambas as concentrações celulares. No entanto, a uma concentração celular mais alta este efeito é também visível às 48 horas, por oposição a um aumento da viabilidade celular verificada na concentração de 10^4 células por poço. Às 72 horas a viabilidade celular aumenta chegando a ultrapassar os 100%, exceto para a concentração 500 µg/ml na concentração celular mais baixa. Assim sendo, globalmente, parece haver um efeito citotóxico às 24 horas e um efeito proliferativo às 72 horas.

Gráfico 7 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de *G. lutea*.

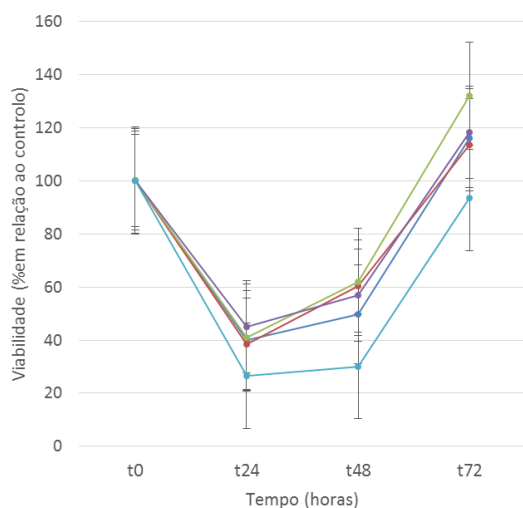
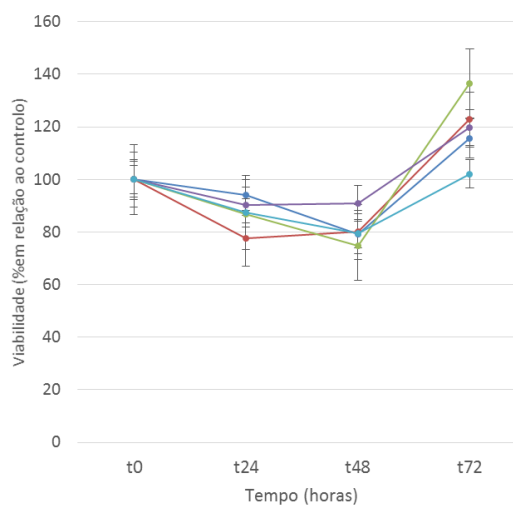


Gráfico 8 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de *G. lutea*.



● 31,25µg/ml ● 62,5µg/ml ● 125µg/ml ● 250µg/ml ● 500µg/ml

Os gráficos 9 e 10 mostram que o efeito citotóxico mais acentuado é visível às 24 horas para a concentração celular mais baixa na presença da concentração de extrato mais alta, efeito já visível no gráfico 5. Na concentração celular mais alta este efeito citotóxico não é tão acentuado, indicando a dependência dos resultados na concentração celular. Por outro lado, às 72 horas, o efeito proliferativo é muito marcado, sendo mais pronunciado na concentração de 125 µg/ml para ambas as concentrações celulares. Assim sendo, o tempo de exposição parece também ser determinante para o efeito observado.

Gráfico 9 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato aquoso de *G. lutea*.

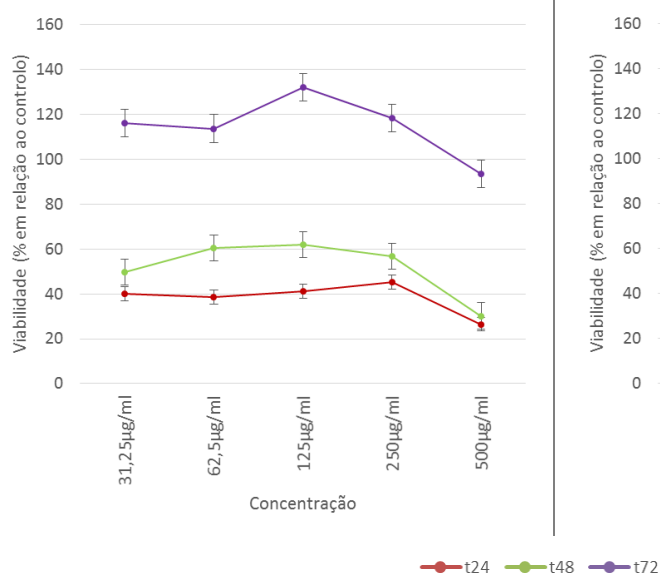
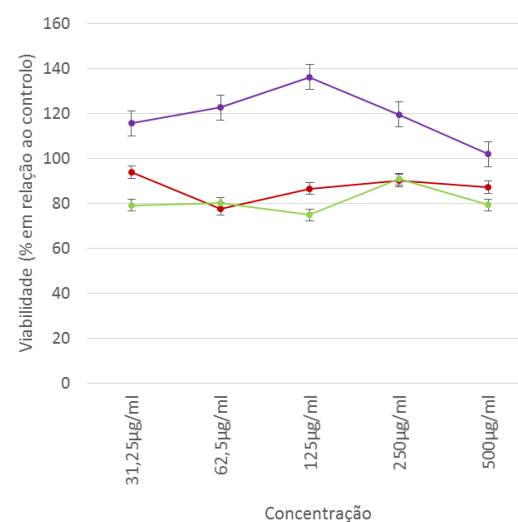


Gráfico 10 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para HeLa, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de extrato aquoso de *G. lutea*.



6.4

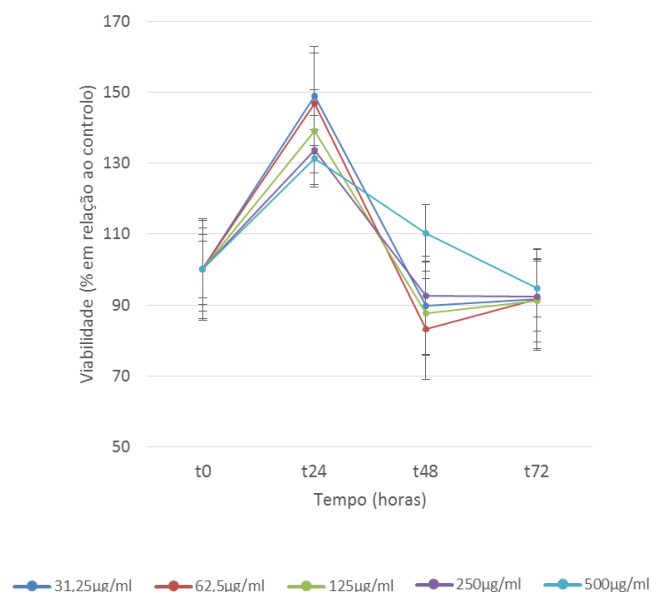
Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico em MCF-7

De seguida apresentam-se os resultados do efeito do extrato etanólico em MFC-7. Apenas se mostram os resultados obtidos com a concentração celular de 10^4 pois na concentração celular mais alta os resultados não foram coerentes.

O gráfico 11 mostra um efeito proliferativo às 24 horas. Às 48 horas, para todas as concentrações, há uma diminuição da viabilidade que permanece praticamente inalterada às 72 horas, exceto para a concentração de 125 µg/ml, que mostra um ligeiro aumento da proliferação, e para a concentração mais alta de extrato, que causa um diminuição da viabilidade às 48 e 72 horas. Para esta última, o efeito proliferativo é menos acentuado e, para além disso, a partir das 24 horas, a viabilidade diminui de forma quase linear em função do tempo.

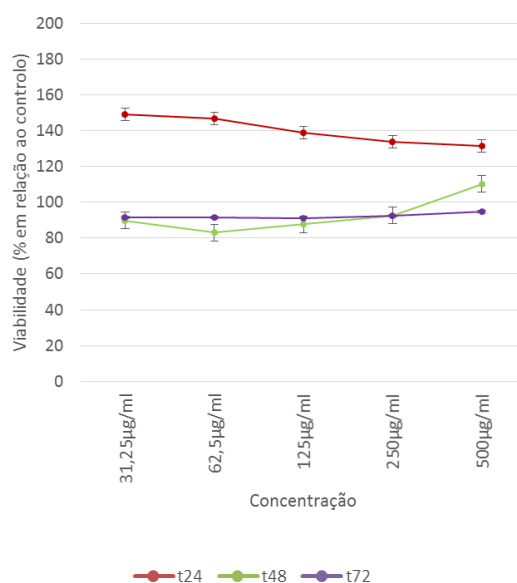
A concentração de de 0,1% de DMSO não mostrou influenciar o crescimento celular (dados não apresentados).

Gráfico 11 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de *G. lutea*.



De acordo com o gráfico 12, às 24 horas a viabilidade diminui com o aumento da concentração, mostrando um efeito dependente da concentração. Às 48 horas a viabilidade é mais alta para a concentração mais alta de extrato e às 72 horas a variação da viabilidade em função da concentração é pouco perceptível.

Gráfico 12 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato etanólico de *G. lutea*.



6.5

Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso em MCF-7

Os gráficos abaixo mostram um possível efeito citotóxico do extrato aquoso de *G. lutea* sobre MCF-7, às 24 horas de exposição. Globalmente, há um notório aumento da viabilidade às 48 e 72 horas.

Gráfico 13 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de *G. lutea*.

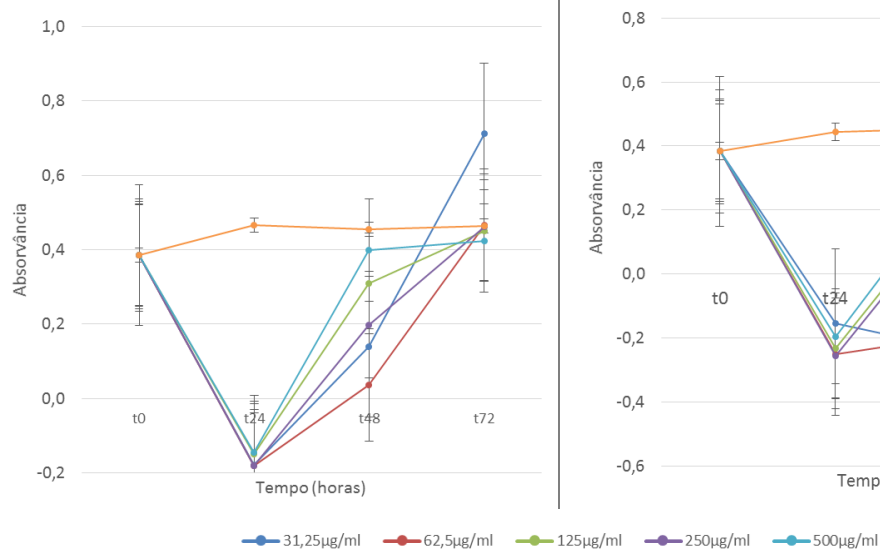
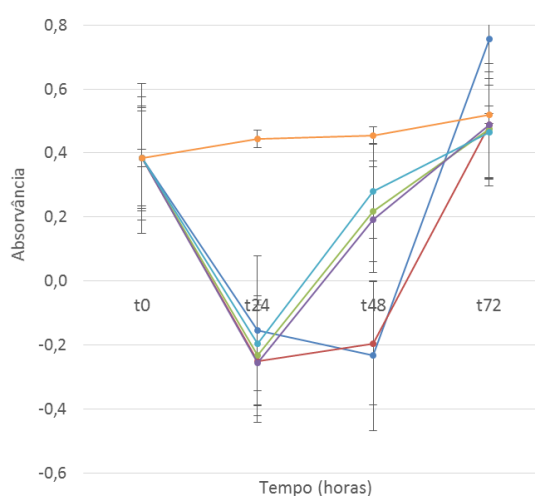


Gráfico 14 - Evolução da viabilidade celular em função do tempo para MCF-7, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de *G. lutea*.



De acordo com os gráficos abaixo, às 24 horas a viabilidade é semelhante para todas as concentrações de extrato. Às 48 horas a variação da viabilidade em função da concentração não é linear, sendo no entanto crescente com o aumento da concentração de extrato e para a concentração celular de 10^5 . Às 72 horas a viabilidade é semelhante para todas as concentrações exceto para a concentração mais baixa, que mostra maior viabilidade celular.

Gráfico 15 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para MCF-7, a uma concentração celular de 10^4 , na presença de extrato aquoso de *G. lutea*.

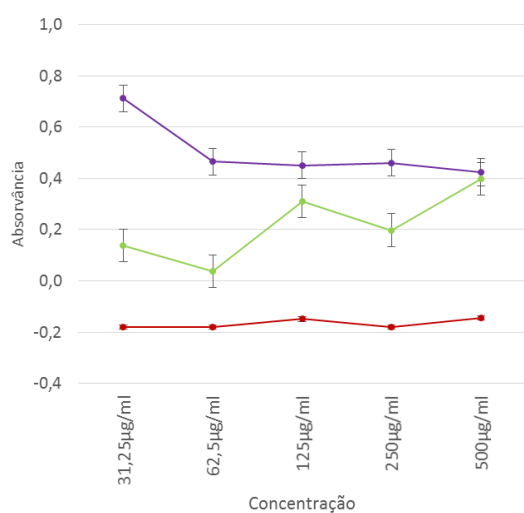
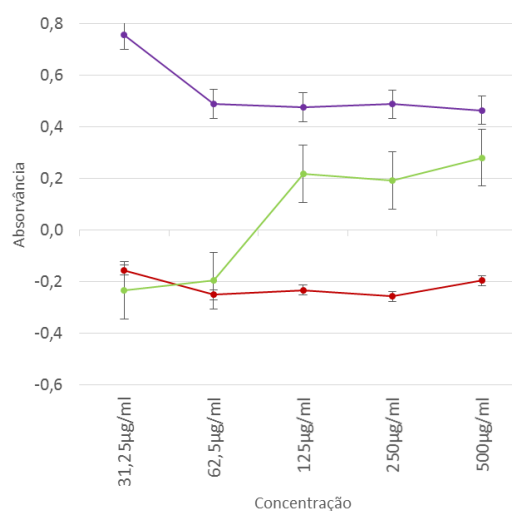


Gráfico 16 - Evolução da viabilidade celular em função da concentração para MCF-7, a uma concentração celular de 10^5 , na presença de extrato aquoso de *G. lutea*.



— t24 — t48 — t72

6.6

Extrato etanólico versus extrato aquoso

Para a linha celular HeLa, o extrato etanólico mostra efeitos contrários ao extrato aquoso, conforme mostra o quadro seguinte.

	Extrato etanólico	Extrato aquoso
HeLa	- aumento da viabilidade às 24 e 48 horas - diminuição da viabilidade às 72 horas	- diminuição da viabilidade às 24 horas - aumento da viabilidade às 72 horas
MCF-7	- efeito proliferativo às 24 horas - efeito citotóxico às 48 horas e 72 horas (apenas realizado para a concentração celular de 10^4)	- efeito citotóxico às 24 horas - efeito proliferativo às 72 horas

Quadro 14 - Comparação dos efeitos do extrato etanólico e aquoso em HeLa e MCF-7.

Para o mesmo extrato, as duas concentrações celulares de HeLa dão efeitos globalmente semelhantes. No entanto, para a concentração celular de 10^4 , verifica-se um efeito proliferativo superior para a concentração mais baixa de extrato etanólico e um efeito citotóxico mais acentuado para a concentração mais alta de extrato aquoso. Assim sendo

o efeito observado depende do tipo e concentração de extrato e do tempo de exposição ao mesmo.

Também para a linha MCF-7, o extrato etanólico mostra efeitos tendencialmente contrários ao extrato aquoso. Na presença do extrato aquoso, duas concentrações celulares parecem causar efeitos semelhantes. Sendo assim, tal como se concluiu para a linha celular HeLa, o efeito observado depende do tipo e concentração de extrato e do tempo de exposição ao mesmo.

Em conclusão:

- O extrato etanólico parece causar um aumento da viabilidade às 24 horas e uma diminuição da viabilidade/efeito citotóxico às 72 horas (este efeito não é observado em MCF-7 para a concentração de 10^5 células por poço, dados não apresentados).
- O extrato aquoso parece causar o efeito contrário, ou seja, uma diminuição da viabilidade/efeito citotóxico às 24 horas e um aumento da viabilidade às 72 horas.

Os resultados deste estudo preliminar sugerem que a *Gentiana lutea* exerce uma ação citotóxica e proliferativa sobre as linhas celulares testadas, sendo esta ação dependente do tempo de exposição e do tipo de extrato.

6.7

Limitações do estudo

De seguida expõem-se as limitações deste estudo e as necessárias medidas corretivas. Para a obtenção de resultados inequívocos é necessário o planeamento criterioso das experiências. Para este trabalho foram particularmente importantes: **i)** os métodos de extração utilizados para a preparação do extrato; **ii)** as linhas celulares selecionadas; **iii)** o método utilizado para a avaliação da citotoxicidade; **iv)** as condições experimentais selecionadas.

- i)** A escolha dos solventes e o método de extração prendeu-se com duas premissas. Por um lado a decoção com água é o método utilizado para a administração de plantas em MTC. Por outro lado, o etanol é um solvente com baixa toxicidade e é utilizado inclusivamente em formulações fitoterápicas (105). Múltiplas variáveis fazem alterar a constituição do extrato, tais como: temperatura durante a extração, tempo de exposição ao solvente, presença ou não de agitação e granulometria da planta. Estes parâmetros deverão ser padronizados para se obterem extratos o

mais semelhantes possível, de forma a obter resultados comparáveis. A própria constituição da planta, devido à sua diversidade fitoquímica dependente das condições ambientais em que cresce, o pode fazer variar a composição do extrato.

- ii) Para este trabalho selecionaram-se duas linhas celulares tumorais indicadoras de dois tipos de cancro muito prevalentes. No sentido de avaliar a citotoxicidade seletiva, tão importante para a extrapolação *in vitro-in vivo*, seria relevante testar também uma linha celular não tumoral.

- iii) Este estudo utilizou o teste de redução do MTT para a avaliação da citotoxicidade. Este teste determina as células metabolicamente ativas, sendo de fácil execução e pode ser realizado em microplaca, o que permite a realização simultânea de vários ensaios. A determinação do tempo de incubação ótimo para cada uma das linhas celulares teria sido importante, pois um tempo de incubação muito curto pode não ser suficiente para que o formazan seja produzido e, em contrapartida, períodos maiores de incubação levam à inibição da atividade enzimática, mesmo quando se tem o reagente em excesso (105). Este método apresenta algumas limitações que importa considerar. As células em início da apoptose apresentam atividade das suas desidrogenases mitocondriais inalterada, o que pode sobrestimar a citotoxicidade dos extratos. Para além disso, dados recentes demonstraram que a mitocôndria não tem um papel exclusivo na redução do MTT e, por outro lado, a toxicidade intrínseca do MTT pode também contribuir para a morte celular (29). Seria útil a realização de outro teste de avaliação da viabilidade celular, no sentido de cruzar resultados e anular as desvantagens existentes.

- iv) Em relação às condições experimentais, e tendo sido utilizadas células aderentes, é de particular importância a escolha do número de células por unidade de superfície. É importante assegurar que, no decorrer do tempo das experiências (72 horas após a adição do extrato), as culturas estão em crescimento exponencial. Seria também importante construir uma curva-padrão de absorvância versus número de células viáveis, para assegurar que, durante o decorrer das experiências, os valores obtidos pelo teste de redução do MTT, a qualquer concentração celular, estava na região de linearidade das respetivas curvas. Adicionalmente, fazer leituras a intervalos de tempo mais curto teria permitido aferir melhor a resposta celular aos extratos estudados que, como vimos, está dependente do tempo de exposição aos mesmos. Atestar que o veículo utilizado para solubilizar o extrato não interfere no crescimento celular é

também uma questão importante a considerar. A utilização de um controlo positivo, como uma substância ou planta com atividade citotóxica conhecida, teria permitido validar melhor os resultados alcançados.

6.8

Perspetivas futuras

Os resultados apresentados precisarão de ser confirmados pela repetição das experiências, o que permitirá também a sua análise estatística. Adicionalmente, em resumo ao exposto no capítulo anterior, para a melhoria da qualidade dos resultados obtidos propõe-se:

- A realização de uma curva-padrão de absorvância versus número de células viáveis.
- A utilização de um controlo positivo (substância com conhecida ação citotóxica).
- A utilização de diferentes concentrações celulares nos ensaios.

Os resultados obtidos são encorajadores e motivam estudos futuros. Assim sendo, no sentido de compreender e aprofundar os resultados obtidos neste trabalho, propõem-se:

- A realização de um teste adicional de avaliação da viabilidade celular através, por exemplo, de avaliação da integridade da membrana celular, tal como o teste do azul tripano.
- A realização de leituras de citotoxicidade a diferentes tempos de exposição ao extrato, mais curtos dos que foram realizados neste estudo. Por exemplo, avaliação da citotoxicidade aos 15 minutos, 1 hora e 12 horas de exposição ao extrato.
- O estudo do efeito dos extratos sobre outras linhas celulares neoplásicas, nomeadamente linhas celulares de cancro do estômago, devido à ação anti-inflamatória da planta sobre o sistema digestivo.
- O estudo dos efeitos dos extratos sobre células não tumorais, tal como fibroblastos.
- A realização de testes que permitem identificar o mecanismo envolvido na atividade citotóxica e proliferativa, por exemplo, realização de ensaios de apoptose.
- A realização de estudos de outras atividades biológicas, como a capacidade inibitória da COX-2 e atividade antioxidante.
- O estudo do efeito *in vivo* dos extratos, quer seja em modelos animais saudáveis, para avaliar toxicidade do extrato, quer seja em modelos animais com doença neoplásica, para avaliar o possível efeito anticancerígeno.

- O estudo de extratos obtidos por outras condições de extração utilizando, por exemplo, outros métodos (ex: soxhlet), outros solventes (ex: DMSO), e outros binómios tempo/temperatura.
- Os extratos utilizados deverão ser padronizados pela homogeneização da sua granulometria, por exemplo, por tamização, idealmente após a moagem da raiz para assim aumentar a superfície de contacto com o solvente.
- A realização do fracionamento dos extratos, por métodos cromatográficos, por exemplo, para identificar a fração mais ativa ou mesmo a molécula responsável pelas atividades verificadas.

Não foram encontrados trabalhos que documentem uma ação simultânea de citotoxicidade e efeito proliferativo por parte de extratos de plantas utilizadas em MTC. É conhecida a atividade antitumoral de plantas consideradas amargas e frias à luz da MTC, mas para extratos de *G. lutea* essa atividade não está descrita, embora moléculas isoladas desta planta tenham sido já testadas em linha celulares tumorais, ainda que com atividade pouco expressiva. Em conclusão, os resultados obtidos abrem uma janela de oportunidade para o conhecimento das plantas utilizadas em fitoterapia chinesa, uma vasta área ainda por explorar.

7

CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo fazer um estudo preliminar do efeito citotóxico de extratos de *Gentiana lutea* em linhas celulares neoplásicas. Diferentes concentrações de extrato etanólico e aquoso foram testadas em duas linhas celulares: HeLa, de cancro do colo do útero, e MCF-7, de cancro da mama. A viabilidade celular foi avaliada durante 72 horas através do teste de redução de MTT.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os dois extratos atuam de forma contrária nas duas linhas celulares estudadas: o extrato etanólico parece causar um aumento da viabilidade às 24 horas e um efeito citotóxico às 72 horas, em oposição ao extrato aquoso que parece causar um efeito citotóxico às 24 horas e um aumento da viabilidade às 72 horas.

A validação dos resultados obtidos através da repetição dos ensaios, o fracionamento dos extratos, o isolamento, elucidação estrutural e estudo isolado das moléculas produzidas por esta planta, assim como a clarificação dos mecanismos celulares envolvidos nestas atividades, são etapas importantes para a continuação deste trabalho.

A Organização Mundial de Saúde reconhece o benefício da MTC e aconselha a sua integração nos Sistemas Nacionais de Saúde, não só pelo benefício na saúde das populações como também pela necessária exigência e rigor subjacente à respetiva formação académica que tal integração iria representar (106; 107).

A fitoterapia chinesa, um importante braço da MTC, baseia-se na utilização de misturas de plantas medicinais que atuam em sinergia para produzir um efeito terapêutico e para reduzir efeitos adversos. Ao contrário da abordagem do medicamento ocidental, que atua maioritariamente sobre um alvo terapêutico, a fitoterapia chinesa foca vários alvos e tem vários mecanismos de ação em simultâneo. Mesmo com a metodologia moderna de isolamento e análise de compostos fitoquímicos, é difícil provar estas ações sinérgicas de dezenas de moléculas existentes nas várias plantas que constituem uma decocção. Por outro lado, o processo de desenvolvimento do medicamento, que se inicia com estudos laboratoriais de investigação básica e termina em estudos clínicos de larga escala, não se aplica às formulações de fitoterapia chinesa, pois o seu conhecimento tem por base a experiência empírica adquirida ao longo de milénios.

O estudo da fitoterapia chinesa, nomeadamente na área do tratamento do cancro, visa contribuir para a melhoria do tratamento desta doença cada vez mais prevalente. No entanto, para garantir a qualidade, eficácia, segurança e benefício dos produtos à base de

plantas de fitoterapia chinesa é essencial estabelecer critérios de qualidade, para os quais é necessário apostar em:

- Estudos sobre a constituição química das plantas;
- Investigação sobre os mecanismos fisiológicos e farmacológicos das plantas de fitoterapia chinesa;
- Realização de mais ensaios clínicos, idealmente randomizados, duplamente cegos e controlados por placebo;
- Estudos toxicológicos das plantas utilizadas e implementação de sistemas de farmacovigilância;
- Regulamentação adequada para a produção, distribuição, venda e utilização de plantas ou produtos derivados de plantas de fitoterapia chinesa.

A Medicina Integrativa refere-se ao uso coordenado de cuidados de saúde convencionais e de terapêuticas não convencionais baseadas na evidência, onde a MTC se insere. É a visão integradora e multidisciplinar dos diferentes ramos de uma mesma Medicina que permitirá obter os melhores resultados no tratamento da doença cancerígena, traduzindo-se em benefícios para a saúde dos indivíduos, famílias e sociedade.

8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO (World Health Organization). 2017. *Acedido a 4/6/2017*.
<http://www.who.int/cancer/en/>
2. Seabra AS. 2015. Effect of qigong in natural killer cells on colo-rectal cancer patients undergoing for chemotherapy: A prospective, randomized and controlled study - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:103
3. Porkert M. 1983. The Essentials of Chinese Diagnostics. *Acta Medicinae Sinensis Chinese Medicine Publications Ltd. - Switzerland*:292
4. Greten HJ. 2007. Understanding TCM - The Fundamentals of TCM - Part I (unrevised course version). *Heidelberg School Editions - Heidelberg*
5. Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70:461-77
6. RORENO. 2016. Registo Oncológico Nacional 2010. *Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil – EPE*
7. DGS (Direção geral de Saúde). 2012. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas - Orientações Programáticas. *Direção Geral de Saúde*
8. Silva T, Butera A, Leal D, Alves R. 2007. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43:1-17
9. Albini A, Sporn MB. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews* 7:139-47
10. Croce CM. 2008. Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine* 358:502-11
11. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, et al. 2013. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences* 14:21087-113
12. Potter JD. 2007. Morphogens, morphostats, microarchitecture and malignancy. *Nature Reviews Cancer* 7:464-74
13. Muller AJ, Prendergast GC. 2005. Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say I DO? *Cancer Research* 65:8065-8
14. Gatenby RA, Gillies RJ. 2008. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Reviews* 8:56-61
15. Magnon C. 2015. Role of the autonomic nervous system in tumorigenesis and metastasis. *Molecular & Cellular Oncology* 2:e975643
16. Burstein HJ, Schwartz RS. 2008. Molecular Origins of Cancer. *New England Journal of Medicine* 358:527

17. Tang C, Ang BT, Pervaiz S. 2007. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *The FASEB Journal* 21:3777-85
18. Illumina. 2017. Acedido a 9/9/2017. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research_reviews/cancer_research_review.pdf
19. Fiori M, Villanova L, De Maria R. 2017. Cancer stem cells: at the forefront of personalized medicine and immunotherapy. *Current Opinion in Pharmacology* 35:1-11
20. Simula L, Nazio F, Campello S. 2017. The mitochondrial dynamics in cancer and immune-surveillance. *Seminars in Cancer Biology*:1-14
21. Rajabi M, Mousa SA. 2017. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines* 5:1-12
22. Li S, Sun Y, Gao D. 2013. Role of the nervous system in cancer metastasis. *Oncology Letters* 5:1101-11
23. Huang Y, Miao Z, Hu Y, Yuan Y, Zhou Y, et al. 2017. Baicalein reduces angiogenesis in the inflammatory microenvironment via inhibiting the expression of AP-1. *Oncotarget* 8:883-99
24. Hong JT, Son DJ, Lee CK, Yoon DY, Lee DH, Park MH. 2017. Interleukin 32, inflammation and cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 174:127-37
25. Zou K, Li Z, Zhang Y, Zhang HY, Li B, et al. 2017. Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. *Acta Pharmacol Sin* 38:157-67
26. Puntoni M, Marra D, Zanardi S, Decensi A. 2008. Inflammation and cancer prevention. *Annals of Oncology* 19 Suppl 7:vii225-9
27. Weber D, O'Brien K. 2016. Cancer and Cancer-Related Fatigue and the Interrelationships With Depression, Stress, and Inflammation. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 22:502-12
28. Li-Weber M. 2009. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treatment Reviews* 35:57-68
29. Soares AS. 2008. Efeito Anti-cancerígeno do Galhato de Epigalocatequina (EGCG) em Células de Melanoma Humano - Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade. *Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto* 129
30. Hussain SP, Harris CC. 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International journal of cancer* 121:2373-80
31. Kang Y, Pantel K. 2013. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 23:573-81

32. Braun S, Naume B. 2005. Circulating and disseminated tumor cells. *Journal of Clinical Oncology* 23:1623-6
33. Faria M. 2015. Efeito da acupuntura nas células nk em doentes com cancro da mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante Estudo prospetivo, randomizado e controlado - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:129
34. Pais I. 2013. Efeito da acupuntura nas células nk em doentes com cancro colorectal submetidos a quimioterapia - estudo prospetivo, randomizado e controlado - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:126
35. Mansour M, Teo ZL, Luen SJ, Loi S. 2017. Advancing Immunotherapy in Metastatic Breast Cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 18:35
36. Cole S, Nagaraja A, Lutgendorf S, Green P, Sood A. 2015. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 15:563-72
37. Horvathova L, Mravec B. 2016. Effect of the autonomic nervous system on cancer progression depends on the type of tumor: solid are more affected than ascitic tumors. *Endocrine Regulations* 50:215–24
38. Zhao CM, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, et al. 2014. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Science Translational Medicine* 6:1-13
39. Huan H, Wena X-d, Chen X-j, Wua L, Wua L-l, et al. 2017. Sympathetic nervous system promotes hepatocarcinogenesis by modulating inflammation through activation of alpha1-adrenergic receptors of Kupffer cells. *Brain, Behavior, and Immunity* 59:118–34
40. Eskelinen M, Ollonen P. 2011. Assessment of 'cancer-prone personality' characteristics in healthy study subjects and in patients with breast disease and breast cancer using the commitment questionnaire: a prospective case-control study in Finland. *Anticancer research* 31:4013-7
41. Chen Y. 2008. Nei Wei Qi Represents Immune System in TCM, Part 1. *Acupuncture Today* 9:1-6
42. Chen Y. 2008. Nei Wei Qi Represents Immune System in TCM, Part 2. *Acupuncture Today* 9:1-6
43. Lukong KE. 2017. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin* 7:64-77

44. Eberhardt A. 2014. Qualidade de vida de mulheres com cancro da mama - Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Oncologia. *Instituto De Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:84
45. Corona SP, Sobhani N, Ianza A, Roviello G, Mustacchi G, et al. 2017. Advances in systemic therapy for metastatic breast cancer: future perspectives. *Med Oncol* 34:119
46. Davis M, Feldman S. 2015. Making Sense of Cervical Cancer Screening Guidelines and Recommendations. *Current Treatment Options in Oncology* 16:55
47. Berman TA, Schiller JT. 2017. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer* 123:2219-29
48. Cristelo D. 2014. Cancro do Colo do Útero e Preservação da Fertilidade - Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*
49. Mendes de Oliveira C, Levi JE. 2016. The Biological Impact of Genomic Diversity in Cervical Cancer Development. *Acta Cytologica* 60:513-7
50. Emens LA. 2008. Chemotherapy and tumor immunity: an unexpected collaboration. *Frontiers in Bioscience* 13:249-57
51. Qi F, Zhao L, Zhou A, Zhang B, Li A, et al. 2015. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. *Bioscience Trends* 9:16-34
52. Konkimalla VB, Efferth T. 2008. Evidence-based Chinese medicine for cancer therapy. *Journal of Ethnopharmacology* 116:207-10
53. Fulda S, Efferth T. 2015. Selected Secondary Plant Metabolites for Cancer Therapy. *World Journal of Traditional Chinese Medicine* 1:24-8
54. Ferreira AA. 2010. Acupuntura na Medicina. *Lidel*
55. White A, Ernst E. 2004. A brief history of acupuncture. *Rheumatology (Oxford)* 43:662-3
56. Porkert M, Hempen C-H. 1995. Classical Acupuncture - the Standard Textbook. *Phainon Ed. and Media GmbH, Acta Medicinæ Sinensis - Germany*
57. Porkert M. 1995. Classical Acupuncture: The Standard Textbook. *Phainon Ed. and Media GmbH, Acta Medicinæ Sinensis - Germany*
58. Porkert M. 2001. Chinese Medical Diagnosis - Comprehensive Textbook. *Phaicon Editions & Media GmbH - Germany*
59. Greten HJ. 2007. Kursbuch Traditionelle Chinesische Medizin - TCM verstehen und richtig anwenden. *Georg Thieme Verlag - Deutschland*

60. Martins S. 2015. Comparação de duas estratégias de acupuntura na atividade mioelétrica do estômago - Estudo Preliminar, Prospetivo, Randomizado e Cego - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:92
61. Ernst E. 2006. Acupuncture--a critical analysis. *Journal of Internal Medicine* 259:125-37
62. Correia N. 2011. Effect of Acupuncture in Heart Rate Variability and Non-Invasive Hemodynamic Parameters in Patients With Heart Failure - A Clinical Research Protocol - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:155
63. Seca S. 2011. Efeitos agudos da acupuntura na dor lombar crónica estudo preliminar, prospectivo, randomizado, controlado e cego - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:133
64. Hempen C-H, Chow V. 2006. Pocket Atlas of Acupuncture. *Thieme - Germany*
65. Santos MS. 2012. The effects of Heidelberg Scalp Acupuncture on obstructive sleep apnea - A Preliminar Study - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:135
66. Greten HJ. 2015. Understanding TCM - The Fundamentals of TCM - Part II (unrevised course version). *Heidelberg School Editions - Heidelberg*
67. Ji Q, Luo YQ, Wang WH, Liu X, Li Q, Su SB. 2016. Research advances in traditional Chinese medicine syndromes in cancer patients. *Journal of Integrative Medicine* 14:12-21
68. Chen Z, Wang P. 2012. Clinical Distribution and Molecular Basis of Traditional Chinese Medicine Zheng in Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1-8
69. Greten HJ. 2007. Clinical Subjects - Gastroenterology (unrevised course version). *Heidelberg School Editions - Heidelberg*
70. Greten HJ. 2007. Understanding Chinese Pharmacology (unrevised course version). *Heidelberg School Editions - Heidelberg*
71. Ribeiro A. 2011. Are Classical Chinese Dietetics Functional Vegetative Foods? - Dissertação de Mestrado em Medicina Tradicional Chinesa. *Instituto De Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:118
72. Zhufan X. 2000. Prática da Medicina Tradicional Chinesa. *Icon Editora*
73. Sagar SM, Wong RK. 2008. Chinese medicine and biomodulation in cancer patients—Part two. *Current Oncology* 15:8-30

74. Nie J, Zhao C, Deng LI, Chen J, Yu B, et al. 2016. Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer. *Biomedical Reports* 4:3-14
75. Hsiao WLW, Liu L. 2010. The Role of Traditional Chinese Herbal Medicines in Cancer Therapy – from TCM Theory to Mechanistic Insights. *Planta Medica* 76
76. Zhang Y, Liang Y, He C. 2017. Anticancer activities and mechanisms of heat-clearing and detoxicating traditional Chinese herbal medicine. *Chinese Medicine* 12:20
77. Konkimalla VB, Efferth T. 2008. Anti-cancer natural product library from traditional chinese medicine. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 11:7-15
78. Mirzaee F, Hosseini A, Jouybari H, Davoodi A, Azadbakht M. 2017. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*:1-9
79. Efferth T, Li P, Konkimalla VS, Kaina B. 2007. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends Molecular Medicine* 13:353-61
80. Efferth T, Fu YJ, Zu YG, Schwarz G, Konkimalla VS, Wink M. 2007. Molecular target-guided tumor therapy with natural products derived from traditional Chinese medicine. *Current medicinal chemistry* 14:2024-32
81. Youns M, Hoheisel JD, Efferth T. 2010. Traditional Chinese Medicines (TCMs) for molecular targeted therapies of tumours. *Current drug discovery technologies* 7:37-45
82. Proença de Cunha A, Silva AP, Roque OR. 2009. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. *Fundação Calouste Gulbenkian - Lisboa*
83. Huang SH, Agrawal DC, Wu FS, Tsay HS. 2014. In vitro propagation of *Gentiana scabra* Bunge - an important medicinal plant in the Chinese system of medicines. *Botanical Studies* 55:56
84. EMA (European Medicines Agency). 2010. Assessment report on *Gentiana lutea* L., radix. *European Medicines Agency - London* EMA/HMPC/578322/2008
85. EMA (European Medicines Agency). 2010. Community herbal monograph on *Gentiana lutea* L., radix. *European Medicines Agency - London* EMA/HMPC/578324/2008
86. UTAD (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro). 2017. Acedido a 9/9/2017. https://jb.utad.pt/especie/Gentiana_lutea_subesp_lutea
87. Pinterest. 2017. Acedido a 9/9/2017. <https://br.pinterest.com/explore/gelber-enzian/>
88. Fintelmann V, Weiss RF. 2006. Manual de Fitoterapia. *Guanabara Koogan - Germany*

89. Olivier DK, van Wyk BE. 2013. Bitterness values for traditional tonic plants of southern Africa. *Journal of Ethnopharmacol* 147:676-9
90. Pan Y, Zhao YL, Zhang J, Li WY, Wang YZ. 2016. Phytochemistry and Pharmacological Activities of the Genus *Gentiana* (Gentianaceae). *Chem Biodivers* 13:107-50
91. AEMFTC (Administração Estatal de Medicina e Farmácia Tradicionais Chinesas). 2004. Farmacologia e Medicina Tradicionais Chinesas. *Roca - São Paulo*
92. Rugo H, Shtivelman E, Perez A, Vogel C, Franco S, et al. 2007. Phase I trial and antitumor effects of BZL101 for patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 105:17-28
93. Zhao Q, Chen XY, Martin C. 2016. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Sci Bull (Beijing)* 61:1391-8
94. Klawitter J, Klawitter J, Gurshtein J, Corby K, Fong S, et al. 2011. Bezielle (BZL101)-induced oxidative stress damage followed by redistribution of metabolic fluxes in breast cancer cells: a combined proteomic and metabolomic study. *International journal of cancer* 129:2945-57
95. Maness L, Goktepe I, Ahmedna M. 2012. In Vitro Cancer Research on Ancient Herbal Remedies: A Changing Trend. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*:13-20
96. Langdon SP. 2004. Cancer cell culture : methods and protocols. *Humana Press Inc - New Jersey*
97. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, et al. 2005. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim* 33:261-87
98. Vega-Avila E, Pugsley MK. 2011. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54:10-4
99. McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D. 2013. Bioassays for anticancer activities. *Methods Mol Biol* 1055:191-205
100. Jamalzadeh L, Ghafoori H, Sariri R, Rabuti H, Nasirzade J, et al. 2016. Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry* In press
101. ECACC S-AEccoc. 2016. Sigma-Aldrich & European collection of cell cultures (ECACC): Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook. *Sigma Aldrich - Saint Louis*:82

102. Assanga I. 2013. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research* 4:60-70
103. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. 2011. Cancer Cell Culture: Chapter 20 - Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Springer*
104. Esteves MP. 2014. Anticancer activity of marine-derived fungi extracts and isolated compounds in human cancer cell lines - Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar. *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto*:110
105. Bergo P. 2015. Padronização de extratos de folhas de Amoreira com potencial fitoestrogênico para Uso no tratamento dos sintomas do climatério - Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em ciências, área de Química Orgânica. *Universidade Federal de São Carlos, Centro De Ciências Exatas e de Tecnologia Departamento de Química - São Carlos*
106. WHO (World Health Organization). 2013. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023.
107. WHO (World Health Organization). 2002. Acupuncture: review and analysis of reports on controlled clinical trials.