



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Efeito da Membrana Amniótica no Carcinoma Hepatocelular**

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho*

Sara Isabel da Silva Guerra

---

2014



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.



*“Recomeça...  
Se puderes,  
Sem angústia e sem pressa.  
E os passos que deres,  
Nesse caminho duro  
Do futuro,  
Dá-os em liberdade.  
Enquanto não alcances  
Não descanses.  
De nenhum fruto queiras só metade.*

*E, nunca saciado,  
Vai colhendo  
Ilusões sucessivas no pomar  
E vendendo  
Acordado,  
O logro da aventura.  
És homem, não te esqueças!  
Só é tua a loucura  
Onde, com lucidez, te reconheças.”*

*Miguel Torga*



## *Agradecimentos*

Todo o trabalho deste ano foi feito com todo um grande esforço e dedicação, e toda a vontade de vencer e finalizar este projeto adveio de várias pessoas a quem tenho de expressar o mais profundo dos agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação e disponibilidade prestados durante o desenvolvimento deste trabalho. Queria agradecer especialmente pela revisão e críticas construtivas ao manuscrito, bem como pela partilha de conhecimento e experiência científica que ajudou no desenvolvimento de todo este trabalho.

Ao Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho, Professor da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientador interno desta tese, pela disponibilidade e pela partilha de conhecimento e experiência científica.

À Doutora Margarida, por ser não só exemplo de trabalho e dedicação ao laboratório mas também pela partilha de conhecimento. Tenho ainda que agradecer a infindável paciência e disponibilidade para resolver qualquer dúvida ou problemática que foram surgindo no decorrer deste ano.

À equipa médica do serviço de Ginecologia dos CHUC, em especial à Médica Especialista Maria João Silva, pela disponibilidade e pelo trabalho árduo que permitiu a realização contínua desta dissertação.

Ao Doutor Artur Paiva e ao Mestre Tiago Carvalheiro, do Instituto Português de Sangue e Transplantação de Coimbra, por toda a infindável disponibilidade e pelo auxílio imprescindível da realização de citometria de fluxo.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua disponibilidade e apoio indispensável para a realização deste projeto, e à Mestre Ana Cristina Gonçalves não só pela disponibilidade e auxílio durante este ano de trabalho, mas também pela amizade e simpatia.

Uma palavra de agradecimento também à Bayer Healthcare pelo fornecimento no sorafenib.

Ao Mestre João Casalta, pela amizade e pela simpatia radiante, mas também pelo seu trabalho e disponibilidade no tratamento estatístico dos resultados desta dissertação.

À Mestre Mafalda Laranjo, pela disponibilidade incansável a cada bater na porta e pela partilha de um grande conhecimento científico que ajudou na realização de trabalho desta dissertação. Um agradecimento especial por todo o apoio e amizade demonstrada ao longo do ano.

À Mestre Catarina Mamede, co-orientadora desta tese, com a qual partilho os meus resultados com muito orgulho, um valente e enorme obrigada. Tenho não só que agradecer pela paciência, dedicação e força de vontade, que ajudou muitas vezes a ganhar força quando os tempos pareciam de desespero, mas também pelo enorme carinho, amizade e acima de tudo apoio incondicional que me ajudou durante todo este ano a seguir em frente e finalizar este projeto.

Às meninas Mestre Salomé Pires e Mestre Ana Brito, tenho que agradecer profundamente toda a simpatia, apoio e preocupação. Além disso tenho também que agradecer pela diversão e alegria que nunca vou esquecer. Um agradecimento também ao Mestre Fernando e à Mestre Sara pela simpatia.

À Sra. Cláudia pela simpatia e um sorriso incansável, que alegrou os dias durante todo este ano.

Aos colegas de tese de mestrado, que são muitos, um enorme obrigado. Todos são de uma maneira ou de outra especiais e foi graças a eles que muitas vezes os ânimos acalmaram quando o mundo parecia estar a desabar, a vocês um muito obrigada.

Ao Mestre Teixeira, Oliveira, Denise, Telmo, Gonçalo Cristóvão, Ana Isabel, Filipa, Mestre Kathleen e ao Gonçalo Brites muito obrigada, não só pela diversão e alegria que contagiava o laboratório mas por todo o apoio e ajuda essencial durante o último ano.

Em especial, à Tânia e ao Sales, pela partilha de uma casa que apesar de pouco tempo, foi uma aventura contagiante, pela amizade incontestável e pelo



apoio incondicional. Para além disso devo também agradecer os momentos de alegria e tristeza que tornaram este ano um ano marcante, mas do qual só se guardarão boas memórias.

Ao João, pelo apoio e ajuda que me levou a suportar o cansaço do trabalho, pela fé que depositou no meu trabalho e nas minhas capacidades, pela extrema paciência e boa vontade que me fizeram ultrapassar várias barreiras e principalmente pela amizade e carinho que foram durante todo este ano um reconfortante abrigo, tanto para os dias maus como para os dias bons.

À minha família, por tudo. Não tenho como agradecer a toda a minha família pelo apoio e preocupação e também pelo orgulho e fé depositados em mim. A eles tenho que agradecer ainda a confiança depositada em mim e a alegria com que vivem mais uma etapa ultrapassada na minha vida.



## Resumo

O carcinoma hepatocelular possui uma elevada incidência e mortalidade, em parte devido ao estadió avançado em que normalmente é diagnosticado e à sua elevada resistência às terapias convencionais, como a radioterapia ou a quimioterapia. Por representar atualmente um problema de saúde pública, é essencial investir em novas terapêuticas para este tipo de cancro.

A membrana amniótica humana (hAM) tem sido referenciada em várias publicações como uma potencial opção na terapêutica oncológica devido às suas propriedades anti-angiogénica, pro-apoptótica e imunoregulatória. De facto, vários derivados da hAM, como as suas células ou o seu meio condicionado, foram já utilizados em estudos *in vitro* e *in vivo* na terapia de vários tipos de cancro. Até agora, não existem dados sobre o efeito anticancerígeno de extratos proteicos de hAM (hAMPE, do inglês, *human amniotic membrane protein extracts*).

Desta forma, este trabalho experimental teve como principal objetivo estudar o efeito do hAMPE em três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular: HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7.

Foi possível verificar através da técnica de eletroforese 2D que o hAMPE é constituído por um elevado número de proteínas, dentro das quais se encontram as proteínas responsáveis pelos efeitos anti-cancerígenos observados durante o trabalho experimental. O hAMPE induziu uma diminuição da atividade metabólica, do conteúdo proteico total e do conteúdo de ADN total em todas as linhas celulares estudadas. Este tratamento revelou também ser capaz de intervir na regulação do ciclo celular das linhas celulares em estudo. Também se verificou

uma indução de morte celular nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, acompanhada por uma diminuição da expressão das proteínas P53 e  $\beta$ -catenina. A linha celular HepG2 sofreu elevados danos no DNA após tratamento, ao contrário das outras duas linhas celulares, cujo DNA não foi danificado. A terapia combinada utilizando hAMPE e os fármacos 5-Fluorouracil, Doxorrubicina, Cisplatina e Sorafenib, revelou ser uma estratégia promissora por potenciar o efeito anti-cancerígeno dos fármacos já utilizados na clínica. Os resultados *in vivo*, apesar de preliminares, corroboraram os resultados observados *in vitro*, sendo que após tratamento com hAMPE se observou uma diminuição da taxa de crescimento tumoral relativamente à condição controlo.

Este trabalho revela o potencial anticancerígeno do hAMPE no carcinoma hepatocelular. Estudos relativos à identificação das proteínas constituintes do hAMPE, o aprofundamento dos mecanismos responsáveis pela morte celular e também a realização de um modelo animal ortotópico e posterior terapia constituem algumas das perspectivas futuras deste trabalho.

## Abstract

Hepatocellular carcinoma has a high incidence and mortality, in part due to the late stage at which is diagnosed and its high resistance to conventional therapies, such as radiotherapy or chemotherapy. Actually, it represents a public health problem and, for this reason, it is essential to invest in new therapies for this cancer.

The human amniotic membrane (hAM) has been referenced in several publications as a potential therapeutic option in cancer due to its anti-angiogenic properties, pro-apoptotic and immunoregulatory properties. In fact, several derivatives of hAM, as their cells or their conditioned medium, were already used in *in vitro* and *in vivo* in several types of cancer therapy. So far, there are no data about the anticancer effect of hAM protein extracts (hAMPE).

Thus, this experimental work aimed to study the effect of hAMPE in three human hepatocellular carcinoma cell lines: Huh7, HepG2 and Hep3B2.1-7.

It was verified by 2D electrophoresis that hAMPE consists in a large number of proteins, within are the proteins which are responsible for the anticancer effects observed in this experimental work. hAMPE induced a decrease in metabolic activity, total protein content and total DNA content in all cell lines of hepatocellular carcinoma under study. Treatment with hAMPE interfered with cell cycle regulation of all cell lines. There was also an induction of cell death in all cell lines of hepatocellular carcinoma, accompanied with a decreased expression of P53 and  $\beta$ -catenin. The cell line HepG2 suffered high DNA damage after treatment, unlike the other two cell lines, whose DNA was not damaged. The combined therapy of

hAMPE with drug 5-Fluorouracil, Doxorubicin, Cisplatin and Sorafenib therapy has proved to be a promising strategy for enhancing the effect of anticancer drugs. The *in vivo* results, although preliminary, corroborate the results observed *in vitro* taking into account that following treatment with hAMPE, a decrease in the rate of tumor growth was observed relatively to control condition.

This work reveals the anticancer potential of hAMPE in hepatocellular carcinoma. Studies concerning the identification of proteins in hAMPE, the study of the mechanisms responsible for cell death and also the realization of an orthotopic model and subsequent therapy are some of the future prospects of this work.

# INDICE

## Capítulo 1

INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O carcinoma hepatocelular.....	3
1.1.1 – Epidemiologia e etiologia .....	3
1.1.2 – Patogénese .....	5
1.1.3 – Diagnóstico e terapêutica.....	8
1.2 - A membrana amniótica .....	14
1.2.1 – Estrutura e função .....	14
1.2.2 – Propriedades da hAM.....	21
1.3– A membrana amniótica e o cancro .....	24

## Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1– Colheita e receção da membrana amniótica .....	33
2.2– Extração e quantificação das proteínas da membrana amniótica ...	34
2.3– Caracterização das proteínas da membrana amniótica.....	34
2.3.1 – Preparação e quantificação da amostra .....	37
2.3.2 – Focagem isoeétrica: primeira dimensão .....	38
2.3.3 – SDS-PAGE: segunda dimensão.....	39

2.3.4 – Detecção de proteínas .....	40
2.4– Estudos <i>in vitro</i> .....	42
2.4.1– Cultura celular .....	42
2.4.2 -Avaliação da atividade metabólica .....	43
2.4.3- Avaliação do conteúdo proteico total .....	44
2.4.4 - Avaliação conteúdo total de ácido desoxirribonucleico .....	46
2.4.5- Avaliação dos danos no ADN através do ensaio cometa .....	47
2.4.6 - Avaliação do ciclo celular através da técnica de citometria de fluxo.....	50
2.4.7 - Avaliação da expressão de P53 e de $\beta$ -catenina através de western blot.....	52
2.4.8 – Esfregaços.....	55
2.4.9 - Terapia combinada.....	57
2.5 – Estudos <i>in vivo</i> .....	59
2.6 – Análise Estatística .....	60

### Capítulo 3

RESULTADOS .....	63
3.1 - Caracterização das proteínas da membrana amniótica.....	65
3.2 - Avaliação da atividade metabólica.....	66
3.3 - Avaliação do conteúdo proteico total .....	70



3.4 - Avaliação do conteúdo em ácido desoxirribonucleico total .....	74
3.5 - Avaliação de atividade metabólica, conteúdo proteico total e conteúdo de ADN total na linha HFF1 .....	77
3.6 - Avaliação de danos no ADN através do ensaio cometa .....	80
3.7 - Avaliação do ciclo celular.....	82
3.8 - Avaliação da expressão de P53 e de $\beta$ -catenina através de western blot.....	84
3.8.1 - Expressão de P53.....	84
3.8.2 - Expressão de $\beta$ -catenina.....	86
3.9 - Avaliação da morte celular.....	89
3.10 - Terapia combinada .....	93
3.11 - Estudos <i>in vivo</i> .....	96
 <i>Capítulo 4</i>	
DISCUSSÃO .....	99
 <i>Capítulo 5</i>	
CONCLUSÕES .....	119
<i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	121



## ABREVIATURAS

<b>5-FU</b>	5- Fluorouracilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>AFP</b>	<i><math>\alpha</math>-fetoproteina</i>
<b>APC</b>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>Cdk2</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
<b>Cdk4</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
<b>Cdk6</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
<b>Cis</b>	Cisplatina
<b>CK1</b>	Casein-kinase 1
<b>CRH</b>	<i>Corticotropin realising hormone</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Doxo</b>	Doxorrubicina
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminatetraacético
<b>EGFR</b>	<i>Endothelial growth factor receptor</i>
<b>EGTA</b>	Ácido tetracético etileno glicol
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FdUMP</b>	Fluorodesoxiuridina monofosfato
<b>FdUTP</b>	Fluorodesoxiuridina trifosfato
<b>FUTP</b>	Fluorouridina trifosfato
<b>GSK3</b>	Glycogen sintase kinase 3
<b>hAECs</b>	<i>Human amniotic membrane epithelial cells</i>
<b>hAM</b>	<i>Human amniotic membrane</i>
<b>hAMCs</b>	<i>Human amniotic membrane mesenchymal cells</i>

<b>hAMPE</b>	<i>Human amniotic membrane protein extracts</i>
<b>hCG</b>	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leucocyte antigen</i>
<b>HSP90</b>	<i>Heat shock protein 90</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<i>Interleucina 1<math>\beta</math></i>
<b>IP</b>	<i>Iodeto de propídeo</i>
<b>IPG</b>	<i>Imobilized pH gel</i>
<b>I<math>\alpha</math>I</b>	<i>Inibidor inter-alfa de tripsina</i>
<b>LEF1/TCF</b>	<i>Lymphoid enhancer-binding factor-1/ T-cell factor</i>
<b>LRP</b>	<i>Low density lipoprotein receptor related protein</i>
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight</i>
<b>mARN</b>	<i>Ácido ribonucleico mensageiro</i>
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i>
<b>MRP1</b>	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NO</b>	<i>Nitric oxid</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
<b>PEDF</b>	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
<b>PGE2</b>	<i>Prostaglandina E2</i>
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	<i>Prostaglandina F2<math>\alpha</math></i>
<b>PgP</b>	<i>Glicoproteína P</i>
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radio-immunoprecipitation assay</i>
<b>RMN</b>	<i>Ressonância magnética nuclear</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>

<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>Sora</b>	Sorafenib
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TCA</b>	<i>Tricarboxylic acid</i>
<b>TIMPs</b>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TOP2<math>\alpha</math></b>	Topoisomerase 2 alpha
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
<b>VHB</b>	Vírus da hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da hepatite C



# *Capítulo 1*

INTRODUÇÃO





## **1.1 O carcinoma hepatocelular**

### **1.1.1 – Epidemiologia e etiologia**

Os tumores do fígado podem ser classificados como primários ou secundários de acordo com a sua origem. Se o tumor do fígado resultar do processo de metastização de um tumor primário localizado noutra órgão, denomina-se o tumor hepático como secundário ou metastático<sup>1,2</sup>.

O carcinoma hepatocelular, que representa cerca de 70 a 90% dos tumores primários do fígado, é o sétimo tipo de cancro mais incidente e o terceiro tipo de cancro mais mortal em todo o mundo, estimando-se que este tipo de cancro tenha sido responsável por 745517 mortes durante o ano de 2012<sup>3</sup>. Mundialmente, o carcinoma hepatocelular é o quinto tipo de cancro mais incidente e o segundo mais mortal no sexo masculino. Relativamente ao sexo feminino, este tipo de cancro representa o nono mais incidente e o sexto mais mortal em todo o mundo<sup>3</sup>.

Em Portugal, a taxa de incidência do carcinoma hepatocelular é relativamente baixa, representando apenas 2% de todos os tipos de cancro (2,7% no sexo masculino e 1,1% no sexo feminino)<sup>3</sup>. Relativamente à taxa de mortalidade associada a esta patologia, esta representa 3,8% de todas as mortes devido à doença oncológica em Portugal (4,6% no sexo masculino e 2,6% no sexo feminino)<sup>3</sup>.

Tal como revelado nas estatísticas internacionais e nacionais, o carcinoma hepatocelular é mais incidente no sexo masculino, fator que pode ser explicado pelo facto dos homens estarem normalmente mais expostos a ambientes mais carcinogénicos (como o tabaco e o álcool) e a infeções pelo vírus da hepatite B

(VHB) e hepatite C (VHC)<sup>4</sup>. Por outro lado, o dano hepático pode ser reduzido pela ação da interleucina-6 através da ação de estrogénios, em maior concentração no sexo feminino<sup>4-6</sup>. Também a ação da testosterona pode promover a proliferação do carcinoma hepatocelular através da sua ação sobre os recetores de androgénio presentes neste tipo de cancro<sup>5,6</sup>.

Relativamente à sua distribuição mundial, sabe-se que o carcinoma hepatocelular é o sexto tipo de cancro mais incidente e o segundo tipo de cancro mais mortal em regiões menos desenvolvidas. Por outro lado, representa o décimo primeiro tipo de cancro mais incidente e o sexto tipo de cancro mais mortal em regiões mais desenvolvidas. A maioria dos casos de carcinoma hepatocelular ocorre na África Subsaariana e na Ásia de Leste. Países do sul da Europa, como a Espanha, a Itália ou a Grécia tendem a ter níveis de incidência média (10-20 por 100 mil indivíduos), enquanto que a América do Norte e do Sul, a Europa do Norte e a Oceânia têm uma baixa incidência deste tipo de cancro (< 5 por 100 mil indivíduos)<sup>3</sup>.

A idade média de diagnóstico do carcinoma hepatocelular pode variar entre 55-59 anos na China e os 63-65 anos na Europa e na América do Norte. Em populações de baixo risco, observa-se uma elevada incidência de carcinoma hepatocelular a partir dos 75 anos de idade. De referir ainda que este tipo de cancro raramente ocorre nas primeiras quatro décadas de vida, com exceção das populações onde a infeção pelo VHB é hiperendémica<sup>7</sup>.

O VHB e o VHC representam importantes fatores de risco para o carcinoma hepatocelular, verificando-se que países com uma elevada prevalência de infeções por estes vírus possuem, normalmente, uma elevada incidência de

carcinoma hepatocelular<sup>4</sup>. Os mecanismos que induzem a formação tumoral associados a infecções por VHB e VHC ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, sabe-se que estes tumores apresentam uma elevada instabilidade cromossômica<sup>8</sup>. Estudos têm evidenciado que existe uma interação entre a hepatite viral, o álcool e a diabetes, com consequências severas sobre o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular<sup>8-10</sup>. Estudos verificaram também que portadores crônicos de VHB possuem um aumento acrescido do risco de carcinoma hepatocelular, comparativamente com a população em geral<sup>11</sup>. Sabe-se atualmente que o VHC aumenta o risco de carcinoma hepatocelular através da promoção de fibrose e de cirrose<sup>11</sup>. A cirrose hepática, atribuída às infecções por VHB e VHC, à ingestão crônica de álcool, à exposição a substâncias químicas tóxicas e certas deficiências metabólicas, pode influenciar largamente o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular<sup>4,11</sup>. Fatores como a obesidade, a diabetes, a esteatose hepática não- Alcoólica e fatores alimentares podem também levar à formação de um fígado cirrótico o que leva, em último caso, ao aparecimento do carcinoma hepatocelular<sup>10,12</sup>.

### **1.1.2 – Patogénese**

Os hepatócitos são células especialmente vulneráveis ao dano resultante da influência de diversos fatores etiológicos devido ao seu papel central no metabolismo de xenobióticos, como o álcool ou os fármacos, à sua participação no metabolismo dos lípidos e dos ácidos gordos e a sua função única na circulação entero-hepática de ácidos biliares<sup>13</sup>. Na verdade, sabe-se que a apoptose dos

hepatócitos pode ser um mecanismo crucial para o desenvolvimento de várias doenças hepáticas, uma vez que o seu aumento está intimamente relacionado com a inflamação e a fibrose<sup>13</sup>. Sabe-se atualmente que os danos hepatocitários, a regulação da morte hepatocitária com constante estímulo pro-apoptótico, a aquisição de um fenótipo alterado (hepatócito displásico), bem como a presença de uma matriz extracelular hepática alterada, são essenciais no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular<sup>13,14</sup>.

As células do carcinoma hepatocelular possuem mutações num elevado número de genes, o que induz um grande número de mutações em inúmeras proteínas, como a P53, a  $\beta$ -catenina ou a polipose adenomatosa coli (APC, do inglês *adenomatous polyposis coli*)<sup>15</sup>. Modelos recentes sugerem que o carcinoma hepatocelular se desenvolve através de diversos mecanismos de ação independentes que têm por base mutações nos genes que regulam a P53 ou a  $\beta$ -catenina<sup>16,17</sup>.

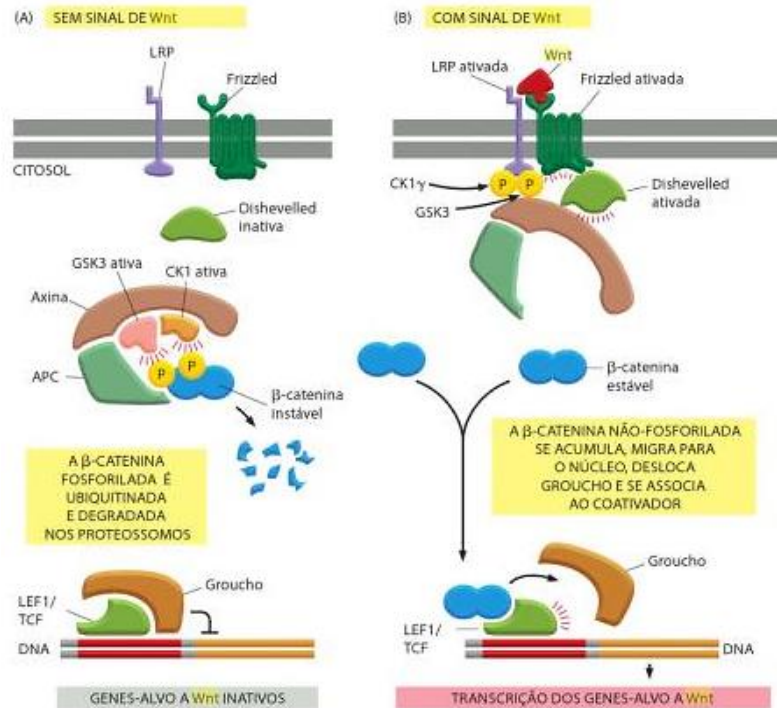
A P53 é uma proteína citoplasmática codificada pelo gene TP53, localizado no braço curto do cromossoma 17, na posição 17p13.1, cujas funções enquanto supressora tumoral revelam o importante papel que desempenha na regulação da ativação da transcrição de genes reguladores do crescimento, divisão, e progressão do ciclo celular<sup>18</sup>. Esta proteína encontra-se normalmente presente em baixas concentrações na célula, contudo, a sua transcrição pode ser ativada por estímulos, tais como danos no ácido desoxirribonucleico (ADN)<sup>19</sup>. A sobreexpressão desta proteína pode ativar vias que podem conduzir ao bloqueio do ciclo celular e à apoptose. Contudo, por vezes ocorrem mutações nesta proteína, não havendo assim um controlo adequado do ciclo celular<sup>20</sup>. Apesar de

se saber que a P53 é uma proteína que se encontra frequentemente mutada no carcinoma hepatocelular, não se conhecem os mecanismos através dos quais esta proteína se correlaciona com a recorrência tumoral<sup>21,22</sup>.

A proteína  $\beta$ -catenina, originalmente identificada como um componente submembranar do sistema de adesão célula-célula mediado pela caderina, é uma proteína que possui um papel essencial na adesão celular quando localizada na membrana citoplasmática, sendo também responsável pela via de sinalização canónica do Wnt quando se encontra livre no citoplasma<sup>23</sup>. Sabe-se que a reativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, através de mutações nos genes da  $\beta$ -catenina e da axina, está presente em 30% a 40% dos tumores hepáticos<sup>24-26</sup>.

Na ausência de Wnt, a  $\beta$ -catenina liga-se ao complexo de degradação formado pelo APC, axina, glicogénio sintase cinase 3 $\beta$  (GSK3) e caseína-cinase 1 (CK1). Neste complexo, a  $\beta$ -catenina é fosforilada pela CK1 e pela GSK3, o que desencadeia a ubiquitinação e a degradação da  $\beta$ -catenina nos proteassomas. Os genes alvo da via de sinalização wnt mantêm-se inativos pela ligação da proteína Groucho à proteína reguladora génica LEF1/TCF (do inglês *lymphoid enhancer-binding factor-1/T-cell factor*). Por outro lado, se ocorrer a ligação das proteínas wnt ao recetor Frizzled e à LRP (do inglês *low-density lipoprotein receptor related-protein*), os dois tipos de recetores unem-se, resultando no recrutamento do complexo de degradação para a membrana plasmática e na fosforilação da cauda citosólica da LRP pela GSK3 e pela CK1 $\gamma$ . A axina liga-se à LRP fosforilada, sendo inativada e/ou degradada. O complexo de degradação, sem a axina, torna-se inativo impedindo a degradação da  $\beta$ -catenina, podendo esta translocar-se para o núcleo.

No núcleo, a  $\beta$ -catenina liga-se à LEF1/TCF, desloca o co-repressor Groucho e atua como um ativador na estimulação da transcrição dos genes-alvo<sup>27,28</sup> (figura 1.1).



**Figura 1.1 – Sinalização da via Wnt/ $\beta$ -catenina.** (A) Na ausência de wnt, a  $\beta$ -catenina liga-se ao complexo de degradação formado pelo APC, axina, GSK3 e CK1. Neste complexo, a  $\beta$ -catenina é fosforilada pela CK1 e pela GSK3, o que desencadeia a ubiquitinação e a degradação nos proteossomos. Os genes que respondem ao wnt mantêm-se inativos pela ligação da proteína Groucho à proteína reguladora génica LEF1/TCF. (B) A ligação do wnt ao receptor Frizzled e à LRP reúne os dois tipos de recetores, resultando no recrutamento do complexo de degradação para a membrana plasmática e na fosforilação da cauda citosólica da LRP pela Gsk3 e pela CK1 $\gamma$ . A axina liga-se à LRP fosforilada, sendo inativada e/ou degradada. O complexo de degradação, sem a axina, torna-se inativo impedindo a degradação da  $\beta$ -catenina. Esta proteína é posteriormente translocada para o núcleo. No núcleo, a  $\beta$ -catenina liga-se a LEF1/TCF, desloca o co-repressor Groucho e atua como um ativador na estimulação da transcrição dos genes-alvo<sup>29</sup>

### 1.1.3 – Diagnóstico e terapêutica

O carcinoma hepatocelular possui um mau prognóstico e uma sobrevida diminuta, em parte devido ao estadio avançado em que grande percentagem dos carcinomas hepatocelulares são detetados. Todavia, têm vindo a surgir grandes

avanços na Medicina que visam possibilitar uma detecção mais precoce e eficaz da doença, permitindo assim um aumento da taxa de sobrevivência<sup>4,30</sup>.

A ecografia abdominal conjugada com a avaliação da  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), um marcador tumoral do carcinoma hepatocelular, é uma das primeiras estratégias de diagnóstico. No entanto, sabe-se que apesar da presença de AFP sérica ser o principal marcador de carcinoma hepatocelular, esta apresenta uma baixa especificidade e, por isso, a presença da neoplasia deve ser confirmada por métodos complementares de diagnóstico. Para tal, a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética nuclear (RMN) ou o estudo anatomopatológico a partir de biopsia hepática são equacionadas<sup>31,32</sup>.

Relativamente às opções terapêuticas, quando a detecção do carcinoma hepatocelular é realizada num estadio inicial, o transplante hepático é a terapia mais eficaz, permitindo o tratamento em simultâneo do cancro e da doença associada. Contudo, devido à falta de dadores disponíveis e às diminutas compatibilidades entre dador e doente, esta terapia torna-se apenas útil em 5% dos doentes<sup>31-34</sup>. Vale a pena referir que posteriormente ao transplante podem surgir complicações pós-operatórias, como a rejeição do órgão transplantado ou a reinfeção viral<sup>35</sup>.

Outra opção de tratamento, recorrendo a técnicas cirúrgicas, é a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial. Este tipo de tratamento é utilizado em tumores localizados e nunca em doentes que apresentem doença hepática associada. Por este motivo, a concretização desta terapia encontra-se restrita a um número reduzido de doentes. A taxa de sobrevivência a esta terapia pode ultrapassar os

60%-70% ao fim de 5 anos. No entanto, existe uma elevada taxa de reincidência da doença durante o acompanhamento, correspondendo a mais de 50% em 3 anos. Esta elevada taxa de recorrência pode ser o resultado da transmissão por via hematogénica ou à formação de um tumor *de novo*, onde a presença de invasão vascular ou de nódulos adicionais constituem indicadores de recorrência por disseminação<sup>32,33,35</sup>.

Existem ainda outras terapias a que os doentes não candidatos a transplante e a hepatectomia parcial podem recorrer, como a termoablação percutânea, a crioablação e a quimioembolização trans-arterial<sup>31,36</sup>.

Uma vez que o carcinoma hepatocelular é por norma detetado em estadios avançados da doença, inviabilizando a utilização das técnicas curativas já mencionadas, é muitas vezes necessário prescrever aos doentes outros tipos de terapias, como a radioterapia e/ou a quimioterapia<sup>4,11</sup>.

A radioterapia é uma opção terapêutica no carcinoma hepatocelular. No entanto, os resultados obtidos com este tipo de terapia neste tipo de cancro em particular não são animadores, podendo os fracos resultados obtidos ser explicados essencialmente por dois motivos. O primeiro motivo está relacionado com a radioresistência deste tipo de tumores<sup>37</sup>. O segundo motivo deve-se à elevada heterogeneidade dos tumores hepáticos, uma vez que os tumores podem variar distintamente entre si a nível genético, na expressão de diferentes tipos de proteínas e em várias vias de sinalização celular, o que pode explicar a resistência associada à radioterapia<sup>37-39</sup>.

Para além do perfil radioresistente, o carcinoma hepatocelular é também quimioresistente. Por este motivo, a quimioterapia sistémica não é particularmente



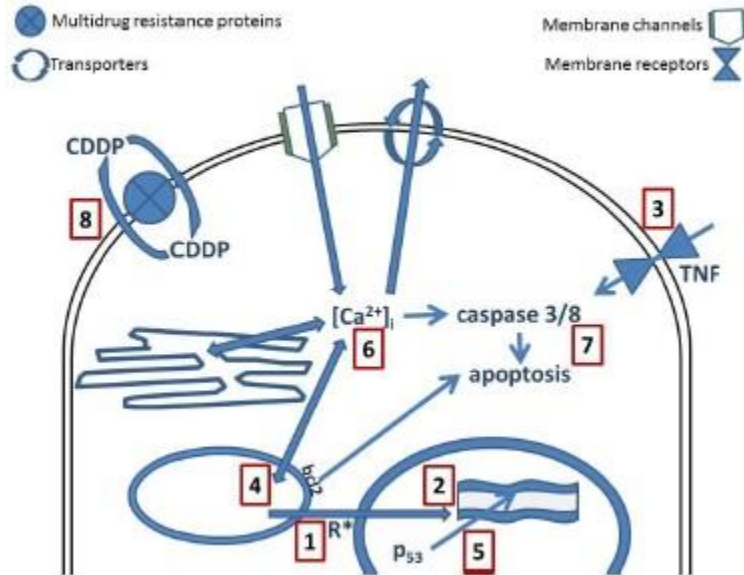
eficaz neste tipo de cancro. Estudos recentes referenciam que as alterações moleculares no carcinoma hepatocelular induzem um desequilíbrio na regulação da apoptose e, conseqüentemente, a resistência à quimioterapia<sup>14,40,41</sup>. O papel da quimioterapia no carcinoma hepatocelular é principalmente paliativo e envolve o controlo dos efeitos do crescimento tumoral e a minimização dos sintomas que dele advêm<sup>42</sup>. A doxorrubicina (Doxo), o 5-fluorouracilo (5-FU) ou a Cisplatina (Cis) são alguns dos agentes utilizados na quimioterapia sistémica do carcinoma hepatocelular<sup>39-42</sup>.

A Doxo é um dos agentes mais utilizados na prática clínica. Contudo, proporciona apenas uma resposta parcial em menos de 10% dos doentes, sem aumento da sua taxa de sobrevivência<sup>40</sup>. Gewirtz *et al.* referiu que a variabilidade de possíveis efeitos celulares da Doxo reportados se poderia dever ao facto de terem sido utilizadas diferentes concentrações deste fármaco nas várias condições experimentais, enfatizando a importância da consideração da concentração do fármaco utilizada em cada estudo particular<sup>43</sup>. Quanto aos seus mecanismos de ação, sabe-se que a Doxo é capaz de entrar no núcleo celular e interagir com a topoisomerase 2, o que se traduz por danos no ADN e na morte celular<sup>43</sup>. Por outro lado, este fármaco pode ser oxidado com formação de semiquinona, um metabolito instável que pode ser reconvertido em Doxo num processo que permite a libertação de espécies reativas de oxigénio (ROS). As ROS podem induzir a peroxidação lipídica e danos membranares, danos no ADN, stresse oxidativo e morte celular.<sup>43-45</sup> Para além da cardiotoxicidade, a resistência celular a este fármaco é também um fator limitante da sua utilização. Mecanismos de resistência que envolvem a glicoproteína P (PgP) ou a proteína 1 associada à resistência a

múltiplas drogas (MRP1) podem estar na base da quimioresistência celular à Doxo. Também a amplificação da topoisomerase 2 alfa (TOP2A) pode estar correlacionada com os mecanismos de resistência celular a este fármaco<sup>43,45</sup>.

O mecanismo de ação a nível celular do 5-FU baseia-se na incorporação de fluoronucleótidos no ácido ribonucleico (ARN) e no ADN, bem como na inibição da enzima timidilato sintase, responsável pela síntese de nucleótidos. Este fármaco é considerado um antimetabolito, atuando como análogo do uracilo com um átomo de fluorina. Sendo um análogo do uracilo, o 5-FU utiliza os mecanismos de transporte facilitado do uracilo, o que lhe permite uma entrada rápida no interior da célula. Intracelularmente, o 5-FU é convertido em diferentes metabolitos, como a fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), a fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) ou a fluorouridina trifosfato (FUTP), que posteriormente desregulam a síntese de ARN e ADN e a ação da enzima timidilato sintase<sup>46,40,41</sup>. Uma vez que a timidilato sintase é responsável pela formação de blocos de timidina-piridina, nucleósidos essenciais à replicação de ADN, a administração de 5-FU leva a uma diminuição da replicação do ADN e, conseqüentemente, à morte celular pela escassez de timidina trifosfato<sup>46,47</sup>.

A Cis não tem surtido efeitos encorajadores no tratamento do carcinoma hepatocelular. A Cis pertence à família dos fármacos que contêm platina na sua estrutura e, similarmente à Doxo e ao 5-FU, atua também ao nível do ADN<sup>48</sup>. A Cis é um fármaco largamente utilizado no tratamento de vários tipos de cancro e a sua função anticancerígena baseia-se na sua capacidade de promoção da apoptose das células através da ativação de várias vias de transdução, como representado na figura 1.2<sup>49</sup>.



**Figura 1.2 – Interações celulares da cisplatina.** (1) Espécies reativas de oxigênio; (2) ADN; (3) Fator de necrose tumoral (TNF); (4) mitocôndria; (5) P53; (6) sinalização do cálcio; (7) caspases e (8) proteínas de multirresistência<sup>49</sup>

Apesar de possuir diversos alvos celulares, o principal alvo da ação da Cis é o ADN<sup>49</sup>. A Cis acumula-se no interior da célula e intercala-se nas cadeias de ADN, levando à formação de aductos que, na maioria das vezes, não são reparados pelos mecanismos de reparação celular. Todavia, têm surgido estudos que revelam vários mecanismos de resistência das células à ação deste fármaco, podendo estes resultar em mecanismos de resistência adquirida ou de resistência celular intrínseca<sup>48,49</sup>.

Os resultados pouco eficazes da quimioterapia sistêmica têm potenciado a procura de terapêuticas dirigidas a alvos moleculares específicos como, por exemplo, a multikinase. O sorafenib (Sora) foi aprovado em 2007 e tem provado aumentar significativamente o tempo de sobrevivência dos doentes com carcinoma hepatocelular com muito poucos efeitos adversos<sup>32</sup>. Este fármaco é um inibidor de várias tirosinas cinases, atuando diretamente nas cinases serina/treonina que são

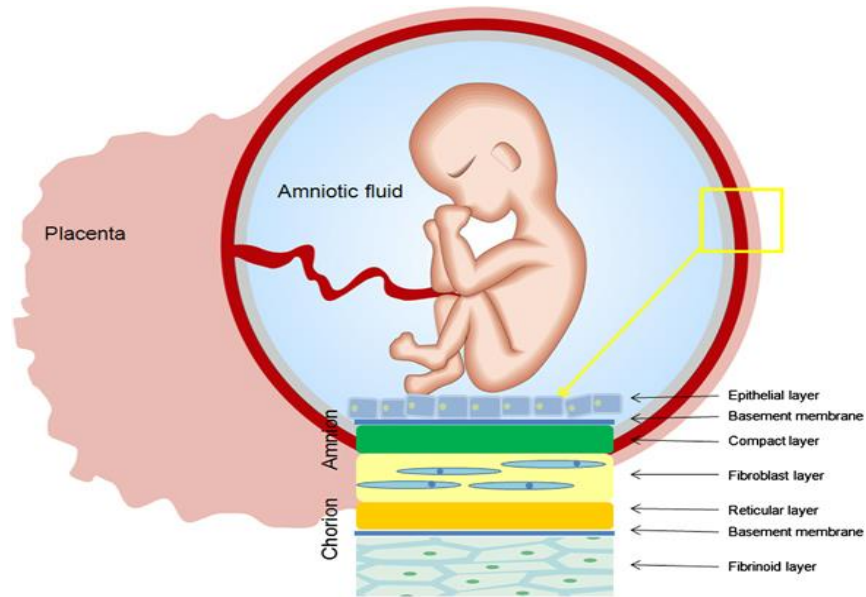
essenciais na sinalização da célula tumoral e na sua proliferação<sup>50</sup>. Para além disso, este fármaco atua ainda em várias tirosina-cinases de recetores envolvidos na angiogénese, incluindo o recetor de fator de crescimento do endotélio vascular 2 (VEGFR2, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 2*) e o recetor do fator de crescimento plaquetário (PDGFR, do inglês *platelet derived growth factor receptor*)<sup>50</sup>.

Tendo em conta a ausência de terapêuticas eficazes para o carcinoma hepatocelular, principalmente em estadios avançados da doença, é particularmente importante encontrar novas terapias que nos permitam reduzir a taxa de mortalidade deste tipo de neoplasia. Neste contexto, surge a utilização da membrana amniótica humana (hAM, do inglês *human amniotic membrane*) como uma possível terapêutica para o carcinoma hepatocelular.

## **1.2 - A membrana amniótica**

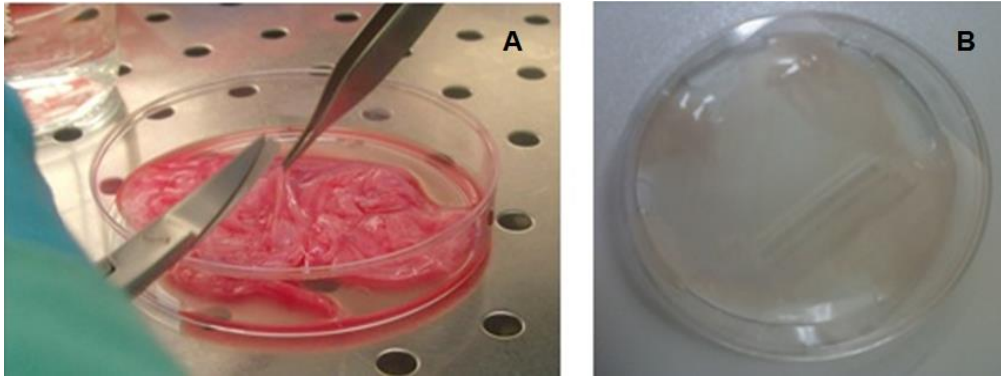
### **1.2.1 – Estrutura e função**

A placenta é um órgão altamente especializado que suporta o normal desenvolvimento do embrião/feto durante todo o período gestacional<sup>51</sup>. Este órgão é constituído por duas membranas fetais, o córion e o âmnios. O córion, que constitui a camada externa e que contacta com a decídua materna, e o âmnios ou membrana amniótica, que constitui a camada interna da placenta e que está em contacto direto com o líquido amniótico, como representado na figura 1.3<sup>52</sup>



**Figura 1.3 – A placenta humana: córion e membrana amniótica.** O córion é constituído pela camada reticular, a membrana basal e camada fibrinóide. A membrana amniótica é constituída pela camada epitelial, a membrana basal e a camada mesenquimal<sup>53</sup>

A hAM, mostrada na figura 1.4, é uma estrutura avascular que não possui nervos, músculos ou vasos linfáticos. Possui uma espessura que pode variar entre 0,02 e 0,05 mm<sup>54</sup>. Este tecido é constituído por três camadas histologicamente distintas: a camada epitelial, a membrana basal e a camada mesenquimal<sup>53,55</sup>. A camada mesenquimal pode ainda subdividir-se em camada compacta, camada fibroblástica e camada esponjosa<sup>56</sup>.



**Figura 1.4 - A membrana amniótica humana.** Encontra-se representada a membrana amniótica humana antes (A) e após (B) lavagem com tampão fosfato salino

A camada epitelial encontra-se em contacto com a cavidade amniótica e com o líquido amniótico constituindo, assim, a camada mais interna da hAM. É constituída por células epiteliais cubóides que derivam da ectoderme, formando uma camada uniformemente disposta sobre a membrana basal, sendo estas células vulgarmente conhecidas como células epiteliais derivadas da hAM (hAECs, do inglês *human amniotic membrane epithelial cells*). Estas células possuem uma orientação bem definida com um pólo apical em contacto direto com o espaço luminal e um pólo basal em contacto com a membrana basal<sup>57,58</sup>, estando lateralmente ligadas por desmossomas. Intracelularmente, as hAECs possuem um núcleo irregular, grande e homogéneo. Apresentam um número elevado de organelos e várias vesículas pinocíticas. O seu citoesqueleto é altamente funcional e bem formado<sup>59,60</sup>. Para além disto, as hAECs possuem um elevado número de microvilosidades na superfície apical, sendo estas muito numerosas nas zonas mais laterais. Este elevado número de microvilosidades poderá permitir às hAECs não só ter uma participação ativa no transporte intracelular e transcelular, como também ter uma função de secreção ativa<sup>61</sup>.

A membrana basal da hAM é uma das camadas mais espessas encontradas nos tecidos humanos. Esta camada é constituída maioritariamente por colagénio, por elastina, por fibronectina, por laminina e por proteoglicanos<sup>62</sup>.

Sabe-se atualmente que os colagénios do tipo I, do tipo III, do tipo IV, do tipo V e do tipo VI são os mais abundantes na membrana basal das hAM<sup>63</sup>. Pensa-se que os colagénios do tipo I, III e V são os principais responsáveis pela resposta mecânica da hAM. O colagénio do tipo IV localiza-se entre a camada epitelial e a membrana basal da hAM. Pensa-se também que o colagénio do tipo VI proporciona filamentos de ancoragem na interface da hAM<sup>63,64</sup>.

Malak e Bell confirmaram a elevada quantidade de elastina na hAM<sup>65</sup>, atribuindo-se a esta fibra a característica elástica da hAM. A elastina pertence a um complexo de proteínas insolúveis e relativamente pouco estruturadas, que são combinadas entre si covalentemente para formar uma rede elástica<sup>66</sup>.

A fibronectina fetal é uma proteína responsável por manter a estrutura da hAM, devido aos seus múltiplos domínios de ligação às células, bem como aos componentes da matriz extracelular<sup>67</sup>. Tal só é conseguido devido aos domínios especializados capazes de mediar a adesão celular<sup>67,68</sup>.

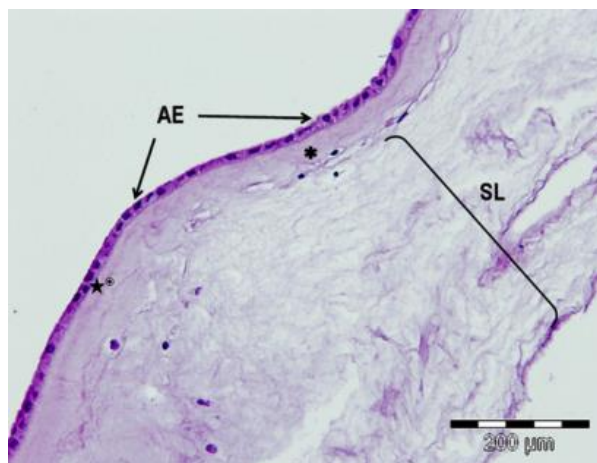
A laminina é uma glicoproteína integrante do esqueleto estrutural da membrana basal de quase todos os tecidos animais<sup>69</sup>. Pensa-se que a laminina pode ter como função o fortalecimento da hAM, uma vez que a laminina é capaz de fixar as hAECs ao estroma através da membrana basal<sup>70</sup>.

Os proteoglicanos são também componentes principais da membrana basal da hAM. Na verdade, foram já identificados proteoglicanos, como a decorina e o biglicano na hAM<sup>71</sup>. Estas macromoléculas são capazes de interagir com as

moléculas de colagénio e promover desta forma a regulação da formação de fibrilhas de colagénio<sup>72</sup>. Por outro lado, são também responsáveis pelas propriedades viscoelásticas da hAM, mantendo a sua integridade tecidular. Os proteoglicanos são também importantes reguladores da proliferação e da diferenciação celular promovendo, através da ligação a fatores de crescimento, processos de remodelação tecidular<sup>72,73</sup>.

A camada mesenquimal pode ser dividida em três partes distintas, a camada compacta, a camada fibroblástica e a camada esponjosa. A camada compacta, forma o principal esqueleto fibroso da hAM<sup>66</sup>, a camada fibroblástica é rica em células fusiformes organizadas com alta mobilidade conhecidas por células mesenquimais derivadas da hAM (hAMCs, do inglês *human amniotic membrane mesenchymal cells*) e a camada esponjosa que encontra-se adjacente ao córion<sup>74,75</sup>. As hAMCs são células que derivam da mesoderme extra-embriónica, exibem uma morfologia fusiforme e formam camadas de células organizadas. São células altamente móveis pois não se encontram ligadas à membrana basal e não estabelecem contactos permanentes com as células do restante ambiente celular<sup>74,76</sup>. A estrutura da hAM encontra-se revelada na figura 1.5, tendo sido obtida através da coloração com hematoxilina e eosina.





**Figura 1.5 - Estrutura da membrana amniótica humana.** A membrana amniótica humana foi corada com Hematoxilina e Eosina. AE: camada epitelial; ★: membrana basal; ⊗: camada compacta; \*: camada fibroblástica; SL: camada esponjosa (adaptado de Díaz-Prado *et al.*, 2011)<sup>105</sup>

A hAM possui inúmeras funções ao longo de todo o período gestacional, sendo que uma das funções essenciais é proporcionar ao embrião/feto proteção e um ambiente de suspensão, onde ele possa crescer livre da pressão das estruturas que o rodeiam<sup>53,56,75</sup>.

A regulação do pH do líquido amniótico é também uma das suas funções essenciais. Esta regulação do pH resulta da existência de anidrase carbônica na camada epitelial da hAM que é responsável pela rápida conversão do dióxido de carbono e água em ácido carbônico. Por este motivo, pensa-se que a hAM pode ser parcialmente responsável pela manutenção do pH do líquido amniótico<sup>75,77</sup>.

A hAM possui ainda um papel crucial nas trocas de água, nutrientes e oxigênio entre os vasos sanguíneos maternos e o líquido amniótico<sup>55</sup>. Para a manutenção da homeostasia, controlo do volume do líquido amniótico e para trocas rápidas de solutos, a hAM expressa diferentes aquaporinas, regulando assim a entrada e a saída de água, bem como o transporte de solutos<sup>78</sup>. A

presença de transportadores de glicose do tipo 1 e 3 na superfície apical das hAECs foi já descrita<sup>79</sup>.

A síntese de substâncias como lípidos e prostaglandinas constitui também um papel essencial durante o período de gestação<sup>80,81</sup>. Yoshimura *et al.* afirmou que os lípidos, derivados da circulação materna, são excretados no líquido amniótico após várias modificações químicas, verificando-se o aumento de lípidos durante a gravidez. Verificou-se que o epitélio da hAM possui elevadas quantidades de glicogénio, podendo este representar uma fonte de energia<sup>81</sup>. Para além da síntese de lípidos, a hAM é uma fonte de prostaglandinas, particularmente a  $E_2$ <sup>80</sup> ( $PGE_2$ ), que tem um papel fundamental na iniciação e manutenção das contrações uterinas. Na verdade, foram já detetadas na hAM várias enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas, tais como a fosfolipase, a prostaglandina sintetase e a ciclooxygenase<sup>82,83</sup>. A hAM expressa também recetores de gonadotropina coriónica humana (hCG, do inglês *human chorionic gonadotropin*), particularmente na camada epitelial, sugerindo um papel determinante da hCG na síntese de prostaglandinas<sup>84</sup>. Para além disso, o ácido ribonucleico mensageiro (mARN) da hormona libertadora de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*) foi detetado na hAM. Sabe-se que a CRH possui um papel importante na modulação das prostaglandinas<sup>85</sup>. As células da hAM produzem também interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) *in vitro*, induzindo desta forma a produção de prostaglandinas. Paralelamente à síntese de prostaglandinas, foi detetada a presença de recetores de oxitocina na hAM. Pensa-se que estes atuem a nível da contração do miométrio quando combinados com níveis elevados de prostaglandina F<sub>2</sub>alfa ( $PGF_{2\alpha}$ )<sup>86</sup>.

Os leucotrienos, derivados do ácido araquidónico, são também produzidos pela hAM. Sabe-se que estes derivados podem afetar a contractilidade uterina, bem como modular a reação imunitária e a vasodilatação<sup>87</sup>.

### 1.2.2 – Propriedades da hAM

Vários estudos demonstraram que a hAM possui inúmeras propriedades: anti-microbiana, anti-viral, imunorregulatória, bacteriostática, anti-inflamatória, anti-aderente, anti-cicatrizial, anti-angiogénica e não é tumorigénica<sup>75,88</sup>. Recentemente verificou-se que a hAM possui também a capacidade de segregar algumas moléculas com atividade pró-apoptótica. Por todos estes motivos, a hAM tornou-se um objeto de estudo devido às suas atrativas propriedades e ao potencial de aplicação clínica<sup>88-90</sup>. No que diz respeito à aplicação da hAM como potencial terapia anti-cancerígena, a sua atividade imunorregulatória, anti-angiogénica e pro-apoptótica parecem ser as características mais relevantes<sup>88</sup>.

Relativamente à sua capacidade de imunorregulação, verificou-se que a hAM inibe a resposta inflamatória<sup>91</sup> e que as células da membrana não expressam o antígeno leucocitário humano (HLA, de *human leukocyte antigen*) -A, -B, -C, -DR ou a microglobulina- $\beta$ 2<sup>92</sup>, apresentando assim fraca imunogenicidade. A expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I foi detetada em quase todas as células com origem na hAM, ao contrário do MHC da classe II<sup>93</sup>. A hAM expressa diferencialmente o HLA não clássico, nomeadamente o HLA-G (antígeno classe

lb), que é capaz de inativar linfócitos e células dendríticas do hospedeiro e suprimir as células T através da ligação CD8 e HLA-G<sup>94</sup>.

Assim, pensa-se que a hAM possa servir de barreira física contra inúmeros fatores que podem iniciar um processo inflamatório, mantendo as células inflamatórias na área afetada e reduzindo desta forma o número de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta<sup>95</sup>. A membrana basal da hAM possui quantidades elevadas de ácido hialurónico que, ao ligar-se ao CD44, expresso nas células inflamatórias inibe a ação das mesmas<sup>96</sup>. Para além disso, o ácido hialurónico tem a capacidade de se ligar ao inibidor inter-alfa da tripsina (I $\alpha$ I), formando um complexo ativo que é responsável pelos efeitos anti-inflamatórios<sup>97</sup>. Um estudo de Ueta *et al.* revelou também a capacidade de inibição da resposta inflamatória através da inibição de citocinas Th1 e Th2, divisão celular e resposta alogénica<sup>98</sup>. A atividade anti-inflamatória que a hAM confere deve-se também a elevadas quantidades de inibidores de metaloproteinases de tecido (TIMP's, de *tissue inhibitors of metalloproteinases*), responsáveis pelo controlo dos processos inflamatórios. Para além disto, as TIMP's regulam inúmeros processos, como a fibrose e a quimiotaxia<sup>56</sup>. O efeito anti-inflamatório da hAM é também caracterizado pela expressão de moléculas como o antagonista do recetor da interleucina 2 (IL-2) e da IL-10<sup>99</sup>. A expressão do agonista do recetor de IL-1 e a expressão de IL-10 potencia o controlo intrínseco da inflamação da hAM<sup>100</sup>. A inibição da expressão de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pela membrana basal da hAM pode ser uma das causas responsáveis pela diminuição da inflamação aquando de um transplante utilizando a hAM<sup>101</sup>. Para além disso, a expressão do ligando Fas nas células da hAM explica também o seu efeito imunossupressor. Deste modo,

constata-se uma proteção da interface feto-mãe. Sabe-se também que as hAECs inibem a migração de macrófagos através da segregação do fator inibitório de migração de macrófagos<sup>100</sup>. O estudo de Zang *et al.* referiu a existência de uma proteína inibidora da elastase dos leucócitos<sup>102</sup>. Quando as células amnióticas são expostas à IL-1 e ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , de *tumor necrosis factor alfa*) a expressão desta proteína aumenta, o que pode explicar os mecanismos de defesa do sistema imunitário durante a gravidez<sup>102</sup>.

Para além deste facto, o sobrenadante da cultura de células derivadas da hAM mostrou ter potencial anti-inflamatório, inibindo a atividade quimiotática dos neutrófilos e dos macrófagos, com redução da proliferação e indução da apoptose das células T e B<sup>36</sup>.

Relativamente à atividade anti-angiogénica da hAM, pensa-se que esta atividade pode ser controlada por dois mecanismos diferentes<sup>103</sup>. O primeiro mecanismo pode estar relacionado com as grandes quantidades de proteínas extracelulares da matriz de hAM, tal como o colagénio do tipo IV e VII, as lamininas -1 e -5, a fibronectina, a angiostatina e a endostatina, que já se provou estarem envolvidas na supressão da neovascularização<sup>103</sup>. O segundo mecanismo foi proposto por estudos recentes, que revelaram que as células da hAM, as hAECs e as hAMCs, produzem vários tipos de citocinas anti-angiogénicas<sup>99,104,105</sup>. Vários estudos já indicaram também a influência de fatores como a trombospondina-1, o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF, do inglês *pigment epithelium-derived factor*) e as TIMP's na atividade anti-angiogénica da hAM<sup>103,106</sup>. Ainda nestes estudos foi revelado que a hAM não só inibe a neo-angiogénese, como também diminui a vascularização já existente no tecido

afetado<sup>103,106</sup>. O mecanismo anti-angiogénico da hAM pode também ser explicado pela ação da hAM como uma barreira física que impede a migração e o crescimento endotelial<sup>99</sup>.

Relativamente à sua propriedade apoptótica, existe muito pouca informação disponível, sendo exemplo os estudos de Li *et al.* e Zhou *et al.* No estudo de Zhou *et al.* polimorfonucleares neutrófilos foram incubados com meio condicionado de hAM e, através da técnica de citometria de fluxo, contabilizou-se o número de células em apoptose. Após 6, 9, 12 e 15 horas de incubação com meio condicionado da hAM os autores verificaram que o número de células apoptóticas aumentava, corroborando o facto de a hAM ser capaz de diminuir a inflamação<sup>107</sup>. Li *et al.* mostraram que a apoptose promovida por hAM não é mediada diretamente por óxido nítrico (NO, do inglês nitric oxide) e pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) mas sim pela inibição das vias de sobrevivências de NF- $\kappa$ B e da Akt-FKHR<sup>108</sup>.

### **1.3– A membrana amniótica e o cancro**

Devido às atrativas propriedades da hAM, nomeadamente à sua atividade imunoregulatória, anti-angiogénica e pro-apoptótica, Seo *et al.* propôs em 2008 que a hAM pudesse ser utilizada na terapia anti-cancerígena<sup>88,109</sup>. No mesmo ano, Evangelista *et al.* escreveu um artigo em que sugeria que as células com origem na placenta pudessem ser utilizadas em estratégias terapêuticas com o objetivo de restaurar a funcionalidade de órgãos e tecidos através de transplante

alogénico<sup>55</sup>. Hipotetizando também a possível utilização da hAM na terapia anticancerígena, Mamede *et al.* publicou um artigo de revisão focando as atrativas propriedades de hAM e sua possível correlação com a biologia dos tumores sólidos<sup>75</sup>, evidenciando também as propriedades anti-angiogénica, imunoregulatória e pro-apoptótica deste tecido referidas anteriormente por Seo *et al.*<sup>88</sup>. Para além destas propriedades, os autores referem que a baixa imunogenicidade da hAM permitir-lhe-ia não ser rejeitada pelo sistema imunitário do hospedeiro após transplantação e ainda que a hAM poderia atuar como uma barreira física natural em torno dos tumores, impedindo o fornecimento de nutrientes e de oxigénio às células cancerígenas, dado que hAM sintetiza várias substâncias anti-angiogénicas e é uma estrutura avascular<sup>75</sup>. A sua função como barreira natural pode ser essencial para impedir a proliferação, a angiogénese e a metastização tumoral inibindo, assim, o crescimento tumoral<sup>75</sup>.

Em 2012 surgem os primeiros resultados na área de Oncologia. Magatti *et al.* revelou que as hAMCs eram capazes de reduzir a proliferação de linhas celulares de origem hematopoiética e não hematopoiética em sistemas de cocultura direta ou indireta, sugerindo o envolvimento de fatores solúveis inibitórios segregados pelas hAMCs<sup>110</sup>. Estes autores descobriram ainda que o efeito anti-proliferativo das hAMCs estava relacionado com um atraso na fase G0/G1 do ciclo celular, bem como com a regulação de genes associados à progressão do ciclo celular, como as ciclinas (D2, E1, H) e as cinases dependentes de ciclinas (CDK4, CDK6 e CDK2), assim como a P15 e a P21<sup>110</sup>. Jiao *et al.* (2012) revelou também que as hAMCs são capazes de inibir o crescimento de gliomas *in vivo* (figura 1.6), através do aumento da apoptose tumoral. Os autores verificaram um aumento de

BAX, de capasse-8 e de caspase-2, bem como uma diminuição de BCL-2, nos tecidos excisados após occisão tumoral<sup>111</sup>.



**Figura 1.6 - Administração intra-tumoral de hAMCs inibe o crescimento de glioma C6 *in vivo*.** Na imagem encontram-se representados tumores no dia 30 em ratinhos Balb/c atímicos, o grupo controle (esquerda) tratados com células endoteliais de cordão umbilical humano (hUVECs) ou tratamento com uma única dose de  $2 \times 10^6$  hAMCs intra-tumoral (direita).

No mesmo ano, Kang *et al.* revelou que hAECs possuíam atividade anticancerígena, concretamente no cancro da mama. Os autores verificaram que estas células foram capazes de inibir o crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*<sup>53</sup>.

Foi também feito um estudo *in vivo* de associação terapêutica entre as hAECs e o 5-FU, tendo-se concluindo que a inibição tumoral era maior quando era administrado conjuntamente hAECs e 5-FU, sendo tanto maior quanto maior o número de hAECs utilizado<sup>112</sup>.

Após as publicações dos primeiros resultados experimentais, Niknejad *et al.* propôs que a inibição das metaloproteinases da matriz (MMPs, do inglês matrix metalloproteinases) fosse um dos principais mecanismos de ação anticancerígena das hAECs<sup>113</sup>. Por outro lado, e tendo em conta os resultados previamente publicados por outros grupos de investigação que indicavam que a hAM era capaz de inibir a proliferação celular, bloquear o ciclo celular, induzir



apoptose e inibir a angiogénese tumoral, Niknejad e a sua equipa propuseram que o mecanismo anti-cancerígeno da hAM se deveria à inibição da proteína de choque térmico 90 (HSP90, do inglês *heat shock protein 90*)<sup>114</sup>.

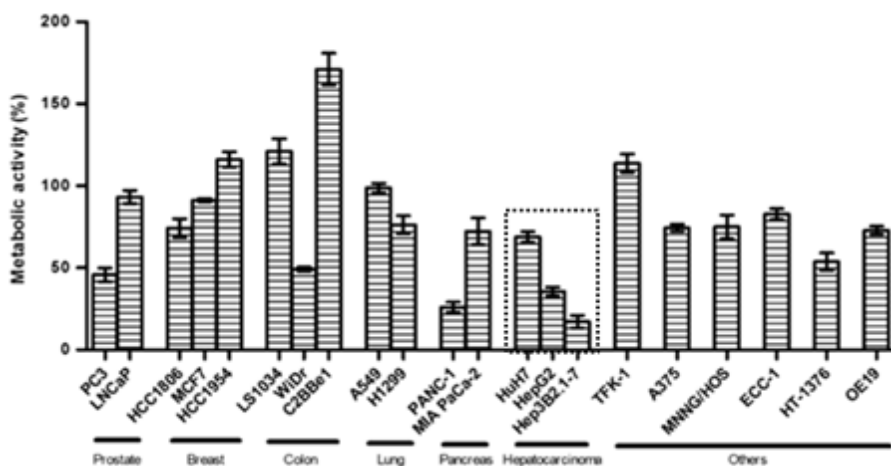
Utilizando uma abordagem terapêutica distinta, em 2014 Niknejad publica um artigo que pretende comparar o efeito do meio condicionado das hAECs com o efeito do meio condicionado da hAM total, tendo-se verificado uma diminuição na viabilidade celular das células tumorais após adição de meio condicionado proveniente das hAECs ou da hAM, bem como um aumento da expressão da caspase-3 e -8<sup>105</sup>.

Recentemente, Rolfo *et al* publicou um artigo em que pretendia averiguar se as hAMCs segregavam fatores capazes de inibir o crescimento de linhas celulares humanas de cancro próstata. Os autores verificaram que, após tratamento com o meio condicionado das hAMCs, o ciclo celular das linhas tumorais em estudo era bloqueado em G0/G1<sup>115</sup>.

A hAM tem também sido considerada para aplicação no local do tumor após ressecção. Resultados provenientes de um ensaio clínico que envolveu cinquenta doentes cujo tumor tinha sido removido entre dois a vinte meses antes do implante com a hAM e em que a hAM foi utilizada para corrigir os defeitos da cavidade oral e da faringe, revelaram a eficácia do processo. A eficácia foi avaliada através de parâmetros relacionados com a dor e com a formação de tecido de granulação e de epitelização local. Para além de uma total adesão da hAM às feridas em todos os doentes, também foi possível verificar que não foram reportadas quaisquer alergias sistémicas ou locais, tendo o transplante da hAM sido considerado efetivo em 10 casos ou muito efetivo 40 casos<sup>116</sup>.

Iravani e a sua equipa publicaram em 2014 um ensaio clínico em que um condrossarcoma de baixo grau da laringe foi tratado cirurgicamente com recurso à aplicação da hAM na região tumoral. Após laringo-fissura, foi feita a ressecção da massa tumoral e a hAM foi aplicada em toda a área com recurso a um *stent* de silicone<sup>117</sup>.

Estudos realizados pela equipa de investigação da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, revelaram que extratos proteicos obtidos da hAM total (hAMPE, do inglês *human amnion membrane protein extracts*) podem ter diferentes efeitos na atividade metabólica de várias linhas celulares humanas de cancro, tais como a estimulação, a inibição ou a ausência de efeito (figura 1.7)<sup>118</sup>.



**Figura 1.7 – Atividade metabólica (%) de linhas celulares cancerígenas humanas após 72 horas de incubação com 1µg/µL de extratos proteicos obtidos da hAM total.** Para cada linha celular, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas. Os valores representam a média ± erro padrão<sup>118</sup>

Através da figura 1.7, pode verificar-se que as três linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano apresentam elevada sensibilidade ao hAMPE.

As linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 apresentaram uma inibição de, respectivamente, 31%, 64% e 83%<sup>118</sup>.

Tendo em conta os resultados obtidos a partir do artigo de Mamede *et al.*, que revelaram uma elevada redução da atividade metabólica das células de carcinoma hepatocelular após tratamento com hAMPE, e tendo em conta as poucas opções terapêuticas para o carcinoma hepatocelular e as atrativas propriedades da hAM, este trabalho tem como objetivo estudar os mecanismos celulares responsáveis pelo efeito do hAMPE nas linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular.



# Capítulo 2

## **MATERIAIS E MÉTODOS**



Tem surgido nos últimos anos um interesse acrescido na compreensão dos possíveis mecanismos anti-cancerígenos da hAM. Sabe-se que este tecido possui um elevado poder anti-angiogénico e imunoregulatório, bem como atividade pro-apoptótica. Assim, com o objetivo de avaliar o potencial anti-cancerígeno da hAM no carcinoma hepatocelular (CHC), bem como esclarecer alguns dos mecanismos de ação envolvidos, foram realizados estudos *in vitro* em linhas celulares humanas deste tipo de cancro, complementados por estudos *in vivo*.

## **2.1– Colheita e receção da membrana amniótica**

A colheita das hAM foi realizada no Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Estas foram obtidas a partir de dadoras saudáveis submetidas a cesarianas eletivas após obtenção do respetivo consentimento informado, redigido de acordo com a Comissão Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (projeto aprovado a 25 de janeiro de 2013).

Após receção no laboratório, as hAM foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) constituído por 137mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7mM de KCl (Sigma, P9333), 10mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, S5011) e 1,8mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, P0662) com pH acertado para 7,4, ao qual foi adicionado 2% de uma solução de antibiótico/antimicótico (Sigma, A5955).

## 2.2– Extração e quantificação das proteínas da membrana amniótica

Com o objetivo de obter um extrato proteico de hAM (hAMPE, do inglês *human amniotic membrane protein extracts*), utilizámos o protocolo descrito por *Shao et al* com algumas modificações, tal como descrito em Mamede *et al*<sup>103,118</sup>. Assim, a hAM foi cortada em pequenos pedaços que foram posteriormente picados com recurso a um bisturi. Após adição de PBS, os pedaços foram colocados em gelo e homogeneizados recorrendo a um *potter*. Posteriormente, os pedaços homogeneizados foram colocados alternadamente num banho de ultrassons e em gelo (1 minuto cada) durante três vezes, seguindo-se uma centrifugação (14000G *durante* 15 minutos à temperatura de 4°C). Após a centrifugação, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante armazenado a -80°C. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado, utilizando um filtro de 0,45µm (Whatman, 10462100), em ambiente estéril e quantificado recorrendo ao NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer, USA).

## 2.3– Caraterização das proteínas da membrana amniótica

A eletroforese 2D, ou bidimensional, tem sido largamente utilizada na análise de proteoma devido à sua alta resolução e reprodutibilidade. Esta elevada resolução deve-se ao facto de esta técnica separar as proteínas tendo em conta dois parâmetros, o seu ponto isoelétrico (primeira dimensão) e o seu peso molecular (segunda dimensão), permitindo uma análise quantitativa do proteoma. Podemos dividir a técnica em quatro partes distintas, como esquematizado na



figura 2.1: a preparação da amostra, a focagem isoelétrica, a eletroforese em gel de poliacrilamida e a detecção das proteínas.

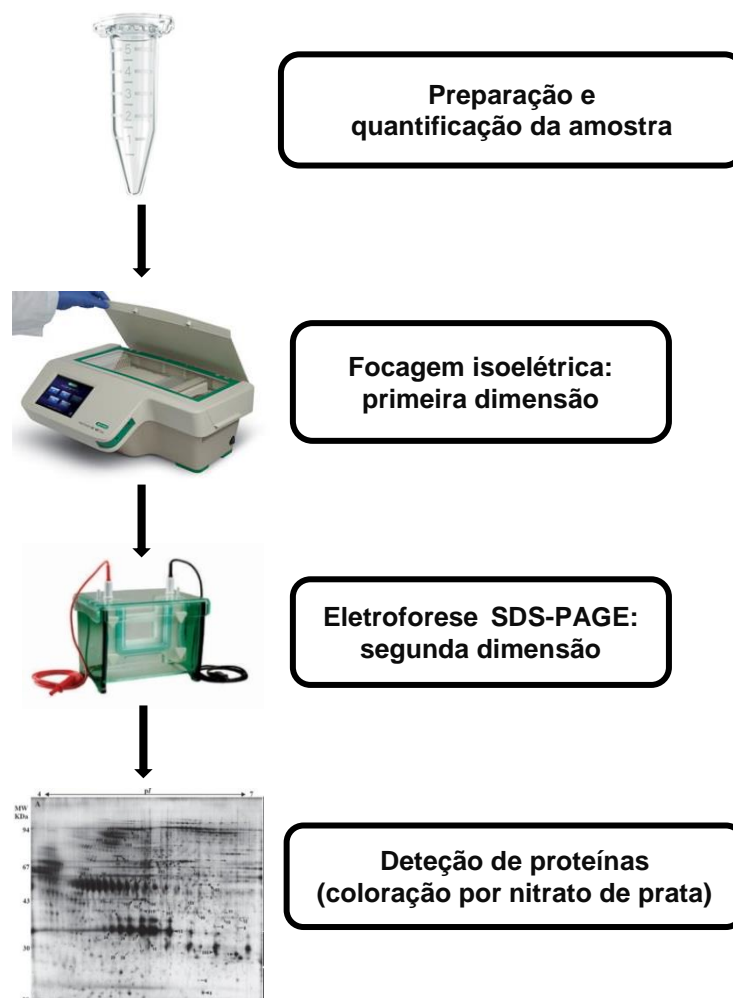
**A. Preparação amostra:** este passo é crucial para permitir uma elevada pureza da amostra evitando assim que qualquer contaminante, como detergentes ou outras proteínas, interfiram na separação. A amostra pode ser obtida a partir de lisados celulares ou homogeneizados tecidulares. A utilização de agentes precipitantes, como a acetona ou o ácido tricloroacético (TCA) é recorrente, pois estes reagentes permitem obter uma elevada pureza e concentração proteica.

**B. Focagem isoelétrica (primeira dimensão):** as proteínas possuem grupos de aminoácidos ácidos e alcalinos que variam a sua carga de acordo com o pH do meio em que se encontram. A carga total de uma proteína é a soma de todas as cargas das cadeias de aminoácidos que a constituem e é a partir desta propriedade que se baseia a separação por focagem isoelétrica. Quando a amostra é colocada numa tira IPG (do inglês *immobilized pH gel*), é aplicado um campo elétrico e forma-se um gradiente de pH que leva à migração das proteínas para o eletrodo com o sinal contrário ao sua carga total. Esta migração ocorre até as proteínas atingirem o seu ponto isoelétrico, que corresponde ao valor de pH onde a carga total da proteína é igual a zero<sup>119,120</sup>.

**C. Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão):** a segunda dimensão consiste na técnica SDS-PAGE (do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*), uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida. A utilização do detergente SDS leva à desnaturação proteica, alterando a conformação nativa da proteína e a sua carga intrínseca. Assim, quando a amostra, distribuída ao longo da tira de IPG, é colocada no gel de

poliacrilamida, as proteínas são separadas exclusivamente de acordo com o seu peso molecular<sup>121,119</sup>.

**D. Detecção das proteínas:** a última etapa da eletroforese 2D baseia-se na detecção das proteínas através da coloração dos géis obtidos. Existem várias técnicas de coloração, como o azul de *coomassie* ou a coloração com nitrato de prata. Estas colorações possuem diferentes propriedades e a sua utilização depende do objetivo pretendido com a separação das proteínas. Para a coloração dos géis foi escolhida a coloração pelo nitrato de prata pela sua alta sensibilidade, por revelar um elevado contraste e por ser uma técnica de coloração rápida.



**Figura 2.1** - Esquema representativo de eletroforese bidimensional.

### 2.3.1 – Preparação e quantificação da amostra

Os hAMPE (0,5mL) foram precipitados com acetona gelada (Sigma, 320110) num volume quatro vezes superior ao volume da amostra. Após adição da acetona, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas a -80°C durante 30 minutos. Terminado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000G à temperatura de 4°C e o processo de adição de acetona e a centrifugação foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi aspirado e permitiu-se que a acetona evaporasse à temperatura ambiente. De seguida, o *pellet* foi solubilizado em tampão de rehidratação [*ReadyPrep™ Protein Extraction Kit (Total Protein)*, Bio-Rad 163-2086]. Todas as amostras foram posteriormente guardadas à temperatura de -80°C.

A quantificação de proteína total das amostras foi realizada pelo método do de 2D Quant kit (GE Healthcare) de acordo com o protocolo definido pelo fornecedor, após descongelamento prévio das amostras. Foi escolhido este método de quantificação pois este kit permite quantificar proteínas em amostras que contenham agentes interferentes como a ureia e a tiourea, compostos que fazem parte do tampão de rehidratação. As amostras foram novamente guardadas a -80°C até posterior utilização.

### 2.3.2 – Focagem isoeletrica: primeira dimensao

Todo o equipamento necessario para a focagem isoeletrica foi previamente limpo com uma solucao 10% de dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma, 436143) e agua destilada. Para iniciar o processo da primeira eletroforese para se conseguir a primeira dimensao foi feita a rehidratacao das tiras de IPG. Estas tiras que tem um gradiente de pH variavel de 3 a 10, foram adquiridas a BioRad (163-2014, BioRad) congeladas e na forma desidratada, pelo que foi necessario efetuar a sua rehidratacao antes de iniciar a focagem isoeletrica. O procedimento inicia-se pelo descongelamento das tiras, sobre papel, durante 15 minutos. O volume equivalente a 20µg de proteina foi diluido em tampao de rehidratacao e a amostra foi posteriormente colocada num corredor do tabuleiro de focagem. A tira foi colocada sobre a amostra, de modo a que o gel ficasse virado para baixo tendo em conta os respetivos polos eletricos e foram removidas todas as bolhas de ar. Sobre a tira foram adicionados 4mL de oleo mineral para evitar a precipitacao e a evaporacao da ureia, contida no tampao de rehidratacao. Seguidamente, as tiras foram retidas com suporte dedicado (*strip retainers* 164-6111, BioRad) para evitar que a formacao de gases durante a eletrólise induzisse a elevacao da tira e, deste modo, interrompesse o contacto eletrico. De seguida, foram programados os passos de rehidratacao e a focagem isoeletrica. A rehidratacao da tira decorreu durante 15 horas, com uma diferenca de potencial de 50V e a temperatura de 20°C, que foi seguida da focagem isoeletrica. Esta, foi realizada seguindo uma sequencia de quatro passos, durante os quais variaram as diferencas de potencial aplicadas as tiras, assim como o tempo de duracao.

Após 15h de rehidratação, os suportes das tiras foram retirados. De seguida o tabuleiro de focagem e o eléctrodo foram desmontados e a tira foi virada de modo a que o gel ficasse virado para cima.. Fragmentos absorventes especiais, humedecidas com água ultra-pura, foram colocados entre as extremidades das tiras e os eléctrodos (*electrode wicks* 1646031, BioRad) para absorver eventuais sais que pudessem estar contidos na amostra. Foram novamente montados os eléctrodos e foi continuado o protocolo definido no IEF Cell (do inglês, *isoelectric focusing cell*)<sup>122</sup> (figura 2.2).



Figura 2.2 - PROTEAN® i12™ IEF Cell

### 2.3.3 – SDS-PAGE: segunda dimensão

Antes de iniciar a segunda eletroforese que nos permite obter a segunda dimensão, a tira foi retirada do tabuleiro de focagem e foi incubada, com agitação leve, durante 10 minutos em tampão de equilíbrio (BioRad,163-2108) com DTT (ditiotreitól) (Sigma, 43815). O DTT é capaz de desfazer as pontes dissulfito, contribuindo assim para a eliminação da estrutura tridimensional das proteínas. Esta incubação foi seguida de uma outra, em tampão de equilíbrio, com

iodocetamida (Merck, L59087244042), para alquilação das proteínas, durante 10 minutos, com agitação leve. Para a realização da eletroforese, foi polimerizado um gel de acrilamida a 10% (BioRad, 161-0158) onde foi colocada a tira, que foi previamente imersa em tampão de eletroforese (BioRad 161-0771). Juntamente com a tira foi colocado um padrão de bandas (BioRad, 161-0373) de modo a facilitar a visualização dos pesos moleculares após separação. Após a colocação horizontal da tira sobre o gel, este foi coberto com uma solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma, A9415) em tampão de eletroforese. A eletroforese foi iniciada com uma diferença de potencial de 80V durante 30 minutos, seguida de um aumento da diferença de potencial para 150V, durante 2 horas.

#### **2.3.4 – Detecção de proteínas**

Para a detecção das proteínas presentes nos géis 2D foi utilizada a coloração por nitrato de prata. Esta coloração baseia-se na ligação dos iões de prata ( $\text{Ag}^+$ ) a aminoácidos básicos das proteínas presentes na superfície da matriz do gel. Quando estes iões são reduzidos a Ag, as proteínas adquirem a cor acastanhada tornando-se visíveis<sup>123,124</sup>.

Para a coloração com prata, o gel foi colocado em agitação suave numa solução de 25% de metanol (VWRProlabo, 20847360) e 5% de ácido acético (Sigma, 33209) durante a noite para fixação das proteínas. Após fixação, a solução foi descartada e foram realizadas várias lavagens com soluções de etanol com diferentes concentrações. Inicialmente foi adicionada uma solução de 50% de

etanol (REDUR, 3000) em água e após 10 minutos de agitação, a solução foi descartada e foi adicionada uma solução aquosa de 30% de etanol, ficando a agitar novamente durante 10 minutos. Finalizado o tempo, a solução foi novamente descartada e foi adicionada uma solução de tiosulfato de sódio (Sigma, 217263) com a concentração de 0,2g/L, durante apenas 1 minuto em agitação, para aumentar a sensibilidade do gel, o que posteriormente facilita a visualização das proteínas. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água ultra pura durante 10 minutos cada. A água foi descartada e foi adicionada uma solução de nitrato de prata (Merck, 3013308) na concentração de 2g/L e o gel foi deixado a agitar durante 20 minutos, para assim ocorrer a impregnação do nitrato de prata no gel. Para a revelação, a solução foi substituída por uma solução constituída por 30g/L de carbonato de sódio anidro (Sigma, 451614), 10 mg/L de tiosulfato de sódio e 0,7mL/L de formaldeído a 37% (VWRProlabo, 90240.9025) em agitação até ao aparecimento de proteínas. Para parar o processo, a solução de revelação foi substituída por uma solução de Trizma Base (Sigma, T1503) na concentração de 50g/L em ácido acético a 2,5%, em agitação durante 1 minuto.

Os géis foram posteriormente fotografados com câmara fotográfica Nikon D3200, com lente AF-S DX Micro NIKKOR 85mm f/3.5G ED VR. Após registo fotográfico dos géis, estes foram armazenados em caixas contendo água ultra pura e 1% ácido acético à temperatura de 4°C.

## **2.4– Estudos *in vitro***

### **2.4.1– Cultura celular**

Neste trabalho utilizámos três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular, designadas por HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, e uma linha normal de fibroblastos, designada por HFF1. As linhas celulares HepG2, Hep3B2.1-7 e HFF1 foram adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC), e a linha celular HuH7 foi obtida a partir da Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB). Todas as linhas celulares foram propagadas em cultura aderente de acordo com as indicações do fornecedor.

Assim, foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, D 5648), suplementado com soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Gibco 10270), numa concentração final de 10%, 1% de antibiótico/antimicótico e 100µM de piruvato de sódio (Gibco, 693). As culturas foram mantidas numa atmosfera constituída por uma mistura de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C.

Para a realização das diferentes experiências, a concentração das suspensões celulares de cada uma das linhas celulares foi ajustada com base na contagem celular obtida pelo método do azul tripano. A utilização deste corante permite-nos avaliar quantitativamente a viabilidade celular pelo cálculo diferencial entre as células viáveis e as células mortas. As células viáveis possuem membranas intactas, evitando a entrada do corante, enquanto as células não viáveis possuem uma membrana corrompida, o que permite a entrada do corante.



Deste modo, as células não viáveis apresentam uma coloração azul, contrariamente às células viáveis, que apresentam um aspeto brilhante.

Assim, para determinar a concentração das suspensões celulares obtidas após dissociação das células com tripsina (Gibco, 25200) 20µL de cada suspensão celular foram diluídos no mesmo volume de azul tripano (Sigma, T0776). Esta suspensão foi colocada numa câmara de Neubauer (figura 2.3), e observada num microscópio ótico invertido (Motic, AE31) com ampliação de 100 vezes, de modo a inferir qual o número de células existente na suspensão.



Figura 2.3- Câmara de Neubauer e método de contagem recorrendo ao corante azul tripano.

#### 2.4.2 -Avaliação da atividade metabólica

Para avaliar o efeito do hAMPE nas linhas celulares, foi realizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensaio colorimétrico baseia-se na redução de MTT pelas células metabolicamente ativas através da ação das enzimas desidrogenases. Estas enzimas clivam os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais de formazano de cor violeta que após solubilização são quantificados por espectrofotometria<sup>125,126</sup>. Assim, o número de

células metabolicamente ativas será proporcional à quantidade de cristais de formazano formados.

Para avaliar os efeitos da incubação do hAMPE na atividade mitocondrial das linhas celulares referidas, 3 de CHC e uma de fibroblastos, foram utilizadas suspensões celulares com  $5 \times 10^4$  células/mL, que foram distribuídas por placas de 24 poços. Após 24h, as células foram incubadas com  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ou  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. O ensaio de MTT foi realizado após 24h e 72h de incubação. Para iniciar este ensaio, o meio de cultura celular foi retirado e de seguida foi adicionado PBS a cada poço para lavagem celular. Posteriormente, adicionaram-se  $200 \mu\text{L}$  de uma solução de MTT (Sigma, M2128) na concentração de  $0,5 \text{ mg}/\mu\text{L}$  em PBS e as células foram incubadas no escuro à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Após 2 horas, foram adicionados  $200 \mu\text{L}$ , a cada poço, de uma solução de isopropanol (Sigma, 278475), com  $0,04 \text{ M}$  de ácido clorídrico 37% fumante (Merck K24620717), e as placas de cultura foram colocadas em agitação até solubilização total dos cristais de formazano formados. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância medida a  $570 \text{ nm}$  com um filtro de referência de  $620 \text{ nm}$ , usando um espectrofotómetro de ELISA (Biotek® Synergy HT). Os valores obtidos após leitura da absorvância foram normalizados ao controlo, ou seja, células sem tratamento.

#### **2.4.3- Avaliação do conteúdo proteico total**

O método da sulforodamina B (SRB) é um ensaio colorimétrico que se baseia na ligação deste corante aos aminoácidos básicos das proteínas celulares. Deste

modo, é possível avaliar o conteúdo proteico já que a ligação de SRB é estequiométrica, ou seja, a quantidade de corante extraído das células coradas é diretamente proporcional ao conteúdo proteico total. Na prática, verifica-se uma cor mais intensa quanto maior o conteúdo proteico presente, o que se traduz numa absorvância superior<sup>127</sup>.

Para realizar este ensaio, seguiu-se o protocolo de distribuição de células e de incubação descrito anteriormente no ensaio de MTT. Após 24h ou 72h de incubação, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS, que foi posteriormente descartado. Seguidamente, foram adicionados 200µL de uma solução com 1% de ácido acético em metanol gelado e as células foram incubadas à temperatura de 4°C durante 1 hora para fixação. A solução de ácido acético foi posteriormente descartada e foram adicionados 200µL de SRB a 0,5% (Sigma, S9012) em 1% de ácido acético. As células foram deixadas a incubar no escuro à temperatura ambiente durante 2 horas, após o que foram lavadas com água tépida até todo o excesso de corante ser eliminado. Seguidamente, adicionaram-se cerca de 200µL de Tris.NaOH na concentração de 10mM mantendo o pH igual a 10 para dissolução dos cristais formados. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância foi registada a 540nm utilizando um filtro de referência de 690nm, num espectrofotómetro de ELISA. Todos os valores obtidos após leitura da absorvância foram normalizados ao controlo, ou seja, aos valores obtidos com as células sem tratamento.

#### **2.4.4 - Avaliação conteúdo total de ácido desoxirribonucleico**

O violeta de cristal, ou violeta de Genciana, é um corante normalmente utilizado para a quantificação do número de células em função da absorvância do corante absorvido pelas células. Este método baseia-se na ligação do corante ao ácido desoxirribonucleico (ADN). Após solubilização do corante, a intensidade da cor púrpura produzida, reflete a quantidade de corante retido pelas células, e é proporcional ao número de células<sup>128</sup>. Tendo em conta o princípio deste ensaio, a sua realização permite avaliar os efeitos da incubação das linhas celulares com hAMPE na quantidade total de ADN.

Para a realização deste ensaio, as células foram distribuídas e incubadas com hAMPE seguindo o mesmo protocolo descrito no ensaio de MTT e de SRB. Após 24h ou 72h de incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram fixadas durante 10 minutos recorrendo à adição de 150µL de metanol. Posteriormente, o metanol foi retirado e foram adicionados a cada um dos poços 200µL de violeta de cristal (Sigma,C3886) mantendo-se em contacto durante 10 minutos. Seguidamente, o corante foi retirado e as células lavadas com água tépida até todo o corante em excesso ser eliminado. Após lavagem, foram adicionados 200µL de isopropanol ácido para dissolução dos cristais e as placas foram colocadas em agitação até dissolução dos cristais. Finalizada a agitação e a dissolução dos cristais, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e as leituras de absorvância foram efetuadas a 570nm utilizando um espectrofotómetro ELISA.

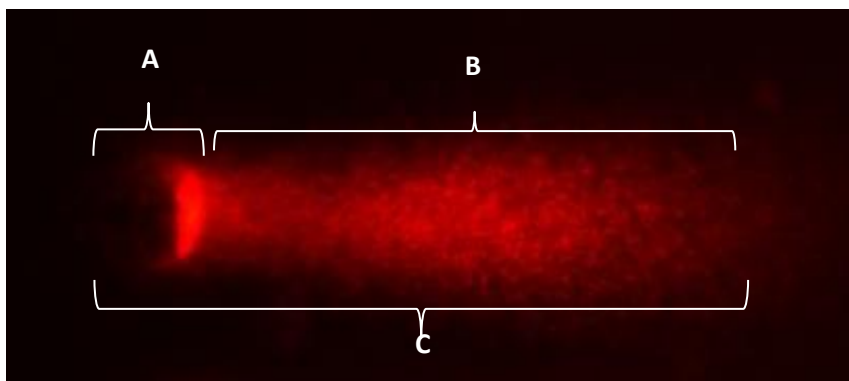
#### 2.4.5- Avaliação dos danos no ADN através do ensaio cometa

O ensaio cometa permite avaliar danos e a reparação no ADN de uma célula eucariótica individual, assumindo cada vez mais um papel essencial na avaliação dos efeitos tóxicos de fármacos assim como a genotoxicidade<sup>129</sup>. Este é um método sensível e económico que combina a eletroforese em gel de ADN com a microscopia de fluorescência. Esta técnica permite verificar a migração do ADN incorporado no gel, obtendo assim “cometas” devido aos variados tamanhos dos fragmentos do ADN danificado. A formação da estrutura de “cometa” está implicitamente relacionada com a migração dos fragmentos de ADN, isto é, se o ADN apresentar danos há um relaxamento dos super-enrolamentos o que, por sua vez, leva a que as extremidades quebradas do ADN migrem para o ânodo. Pelo contrário, quando não existem danos, o elevado peso dos fragmentos impede a sua migração<sup>130</sup>. Assim, a cauda do cometa será constituída pelas extremidades danificadas de menor peso que migraram, enquanto a cabeça do cometa terá como conteúdo o ADN de elevado peso molecular, incapaz de migrar durante um percurso tão grande. Após a realização da eletroforese, as lâminas são coradas com brometo de etídeo e, posteriormente, podem ser analisadas ao microscópio. A partir das imagens obtidas dos cometas e do tratamento das mesmas com recurso a *software* específico, é possível quantificar os danos no ADN através da análise de algumas características como o momento da cauda, que é uma medida da quantidade de DNA e a sua distribuição na cauda, o comprimento da cauda e a percentagem de ADN presente na cauda dos cometas<sup>130,131</sup>.

Este método foi utilizado de modo a avaliar a existência de danos no ADN induzidos por hAMPE.

As três linhas celulares de CHC foram incubadas com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE numa concentração de  $0,25 \times 10^6$  células/mL. Os ensaios cometa foram efetuados 72h após incubação. Após tripsinização, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2500G durante 5 minutos e, posteriormente, foram diluídas de modo a obter suspensões celulares com 50000 células. Preparou-se agarose de ponto de fusão normal (agarose de ponto de fusão normal, Sigma, A2790), a 1,5% para revestimento das lâminas e agarose de baixo ponto de fusão a 1% para ser adicionada às células. Para este último procedimento, foram preparados *eppendorfs* com a solução de agarose a 1% à qual se adicionou a suspensão celular a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , numa proporção de 1:1. Após cuidada homogeneização colocou-se sobre as lâminas revestidas com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%, tendo-se deixado a solidificar a segunda camada de agarose a  $4^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos. Após a solidificação, as lâminas foram colocadas em solução de lise, constituída por 25mM de NaCl, 100 mM de EDTA (Sigma, S4641), 10mM de Tris, 1% de Triton X-100 (Merck, 108603), 10% de DMSO (Sigma, 41640), durante a noite, à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ , para promover a formação de poros e posterior destruição da membrana citoplasmática. Após a solução de lise, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese constituído por 300mM de NaOH (Merck, C294798) e 1mM de EDTA durante uma hora, de modo que as células adquirissem características alcalinas. O tampão de eletroforese utilizado possuía pH superior a 13 para ser possível detetar quebras em cadeias simples e em cadeias duplas de ADN. A eletroforese foi efetuada com

uma tensão de 25mV e uma corrente de 1000mA durante 15 minutos à temperatura de 4°C, numa tina de eletroforese horizontal (BioRAD, EUA). As células foram posteriormente submetidas à solução de neutralização (Tris) na concentração de 0,4M e foram realizadas três lavagens de 5 minutos com esta solução. As lâminas foram coradas com brometo de etídeo com uma diluição de 1:10 a partir de uma solução de 20µg/mL (BioRad, 161-0433), durante 20 minutos. As lâminas foram visualizadas num microscópio Motic AE31 equipado com sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II com lâmpada de mercúrio de 100 watts. Para observar a fluorescência emitida pelo brometo de etídeo foi utilizado um filtro de excitação 540±25nm e filtro de emissão de 605±55nm. As imagens foram adquiridas com uma câmara Moticam 5000 Cooled acoplada a computador com o *software* Motic Images Advanced 3.2. Para cada condição foram adquiridas pelo menos 100 fotos de cometas que foram posteriormente analisados utilizando o *software* Comet score™®, de modo a calcular os parâmetros como o comprimento de cauda, o momento da cauda, a área do cometa e a percentagem de ADN na cauda (figura 2.4).



**Figura 2.4 - Imagem representativa de um cometa.** A – diâmetro do cometa, B - tamanho da cauda, C – tamanho do cometa.

#### 2.4.6 - Avaliação do ciclo celular através da técnica de citometria de fluxo

A citometria de fluxo baseia-se na análise simultânea de várias características de partículas ou células que se encontram em suspensão num meio líquido, fornecendo não só informação quantitativa como qualitativa. No caso de análise de suspensões celulares é possível, para além da contabilização de células, determinar características próprias, desde o tamanho até à sua complexidade<sup>132</sup>.

O funcionamento do citómetro tem como base a dispersão de luz. Existe um fluxo laminar conseguido devido ao revestimento isotónico que atrai as células em suspensão para que fiquem alinhadas e este alinhamento das células no ponto de interseção com o laser leva a que cada célula possa ser analisada individualmente. Quando o fluxo de células, marcadas com sondas ou fluorocromos, passa sob o laser, as moléculas fluorescentes são excitadas para um estado de maior energia, mas assim que regressam ao seu estado fundamental, emitem energia. A luz dispersa e a fluorescência são detetadas por um conjunto de filtros. Estes dados são posteriormente recolhidos por um computador e podem ser processados com *software* adequado<sup>133,134</sup>.

Para avaliar o ciclo celular foi utilizado o ensaio do iodeto de propídeo (IP) e RNase. O IP tem a capacidade de se intercalar no ADN, mas tem também a capacidade de o fazer com o ácido ribonucleico (ARN). Assim, para evitar ligações entre IP e ARN é necessário a utilização de RNase para remover o ARN<sup>135</sup>.

O ciclo celular consiste numa série de eventos que leva à duplicação do material genético de uma célula, resultando na formação de duas células filhas



idênticas entre si. Através da quantificação de ADN é possível estudar as diferentes fases do ciclo celular em que se encontram as células, já que esta técnica tem como premissa a ligação estequiométrica entre o IP e o ADN, permitindo aferir que quanto mais ADN estiver presente, maior será a marcação celular com o iodeto de propídeo<sup>136,137</sup>. Assim, podemos distribuir as células pelas três fases principais do ciclo celular: a fase G0/G1, onde ocorre crescimento celular devido à elevada síntese de proteínas e de organelos; a fase S, onde se dá a replicação do material genético; e a fase G2/M (mitose), onde os cromossomas replicados são distribuídos igualmente pelas células filhas<sup>138</sup>. Assim, com a realização deste ensaio pretendeu-se avaliar se o tratamento com hAMPE induziu alterações no ciclo celular.

Para a realização deste ensaio as linhas celulares foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE e a avaliação do ciclo celular foi feita após 72h de incubação.

Após tripsinização das células, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2500G durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e foram adicionados 200µL de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex. Após incubação durante 30 minutos no escuro à temperatura de 4°C, adicionaram-se 2mL de PBS a cada tubo e procedeu-se novamente a uma centrifugação. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi decantado e adicionaram-se 200µL de IP/RNase (*Kit Immunostep*). As células foram homogeneizadas em vórtex e sujeitas a incubação no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após 15 minutos, as células foram homogeneizadas. Foi utilizado o citómetro BD FACSCalibur™ utilizando o comprimento de onda de emissão de 560nm e excitação 488nm.

#### **2.4.7 - Avaliação da expressão de P53 e de $\beta$ -catenina através de western blot**

A proteína P53 é uma proteína supressora tumoral codificada pelo gene TP53. Esta proteína possui inúmeras funções devido à sua capacidade de atuar como um fator de transcrição, e regula a expressão de um elevado número de proteínas ligadas a processos celulares cruciais como, por exemplo, a apoptose, o ciclo celular, a diferenciação celular e a senescência celular. As mutações no gene TP53 podem levar a alterações na atividade da P53, levando assim à proliferação celular aberrante e a transformação celular<sup>18</sup>. No caso das linhas celulares de CHC utilizadas neste estudo, estão documentadas diferenças relativamente à expressão de P53. Assim a linha celular HepG2 expressa a forma normal da P53, a linha celular HuH7 expressa uma forma mutada da P53 que se traduz por uma sobreexpressão e a linha celular Hep3B2.1-7 que não expressa P53<sup>139</sup>.

A  $\beta$ -catenina é uma proteína que possui um papel essencial na adesão celular quando localizada na membrana citoplasmática e é também responsável pela via de sinalização Wnt/Wingless quando se encontra livre no citoplasma<sup>23</sup>. A  $\beta$ -catenina sofre uma degradação protossomal pelo sistema APC, prevenindo a sua acumulação na célula. Todavia, a mutação na proteína APC é característica de inúmeras células tumorais, e resulta na ausência de degradação da  $\beta$ -catenina. Deste modo, a  $\beta$ -catenina é translocada para o núcleo celular onde ativa a transcrição de vários genes-alvo que levam à proliferação celular e à inibição da apoptose.

A formação de carcinoma hepatocelular está correlacionada com mutações em vários genes supressores tumorais, como o TP53 e o da  $\beta$ -catenina.<sup>27,140</sup>.

Para avaliar se o tratamento com hAMPE resulta em alterações na expressão de P53 e de  $\beta$ -catenina, foi realizada a técnica de western blot.

A técnica de *western blot* baseia-se na detecção de proteínas a partir de amostras de extratos celulares ou de tecidos. Nesta técnica recorre-se a um gel de eletroforese, que permite a separação das proteínas previamente desnaturadas através das diferenças de peso molecular. Após a eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana para serem detetadas através do uso de anticorpos específicos contra a proteína alvo, os anticorpos primários. Após a marcação da proteína com o anticorpo primário, recorre-se a um anticorpo secundário, que liga especificamente ao anticorpo primário, permitindo assim a identificação da proteína em estudo. A marcação e a visualização do anticorpo secundário podem ser feitas através de um filme, que pode ser armazenado e ser visualizado para quantificação dos níveis proteicos<sup>141</sup>. Nesta situação a técnica de *western blot* possui várias vantagens pois as proteínas estão imobilizadas na membrana pelo que se encontram acessíveis para diferentes ligandos, os padrões de eletrotransferência podem ser armazenados durante muito tempo, permite obter várias réplicas de um gel e a proteína transferida pode ser usada para várias análises sucessivas<sup>142,143</sup>.

Para avaliar a expressão proteica de P53 e de  $\beta$ -catenina nas linhas celulares de CHC foram feitos extratos celulares com as proteínas para posterior avaliação por western blot. As suspensões celulares obtidas foram distribuídas por placas de 6 poços e foram posteriormente incubadas com 1 $\mu$ g/ $\mu$ L de hAMPE. Após 72 horas de incubação, o meio de cada um dos poços foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Em cada poço foram adicionados cerca de 100 $\mu$ L

de tampão RIPA (*radio-immunoprecipitation assay*) constituído por NaCl na concentração de 150mM, Tris na concentração de, 50mM, ácido tetracético etileno glicol (EGTA, Sigma, E4378) na concentração de 5mM, Triton a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5% e SDS (Sigma, 436143) a 1% suplementado com Complete Mini que é um cocktail de inibidores de proteases (Roche, 11836153001) e DTT. Todo o processo foi realizado em gelo e foram utilizados raspadores para facilitar a dissociação das células da superfície dos poços e permitir a sua lise. Os lisados obtidos foram transferidos para *ependorfs* e foram posteriormente sujeitos a sonicação. De seguida, os lisados foram centrifugados a 14000G, durante 15 minutos, a uma temperatura de 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos *ependorfs* e armazenados à temperatura de -80°C.

A quantificação de proteína total das amostras foi realizada pelo método do de BCA, do inglês *bicinchoninic acid* (BCA™ Protein Assay kit, Pierce) de acordo com o protocolo definido pelo fornecedor.

Para iniciar o processo, as amostras foram desnaturadas à temperatura de 95°C durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante constituída por 250mM de Tris a pH de 7,4, 30% de glicerol, 10% de SDS, 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck, 8057400250) e 0,05% de azul de bromofenol.

Para a realização da eletroforese foram polimerizados géis de 10% de acrilamida que foram colocados no sistema eletroforese com tampão apropriado constituído por 25mM de Tris, 192mM de glicina e 0,1% SDS (BioRad, 161-0732) e, seguidamente, foram dispostas as amostras e o padrão de pesos moleculares. Inicialmente a eletroforese foi realizada durante 30 minutos com uma diferença de potencial de 80V e, posteriormente, com 150V. Finalizada a eletroforese, os géis

foram colocados em contacto direto com membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno; Bio-Rad, 162-0177) previamente ativadas em metanol. O sistema de transferência foi preparado e a transferência foi efetuada com uma diferença de potencial de 100V, em tampão CAPS constituído por 100mM de ácido N-ciclohexil-3-aminopropanossulfónico) (Sigma, C2632) a pH 11. Terminada a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de TBST-BSA 4% (*Tris-Buffered Saline Tween-20 - bovine serum albumine*), à temperatura ambiente, durante 1 hora. Seguidamente as membranas foram colocadas em agitação constante à temperatura de 4°C com os anticorpos primários de P53 (Santa Cruz, DO-7, 47698) e de  $\beta$ -catenina (Santa Cruz, E5, 7963), durante a noite. Após 24h, foram feitas lavagens com TBS-T a 1%, e as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado (Santa Cruz, 3738), sob agitação constante e à temperatura ambiente. Após 1 hora, foram repetidas as lavagens com TBS-T a 1% e as membranas foram seguidamente incubadas com substrato enzimático (ECF *Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 2 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

#### **2.4.8 – Esfregaços**

A apoptose, morte celular programada, funciona como um mecanismo homeostático durante o desenvolvimento e envelhecimento normal de uma população de células nos tecidos. Para além de ser um mecanismo de homeostasia é também um mecanismo de defesa, quando ocorre em reações

imunes ou após lesão celular por agentes nocivos. Apesar de existir uma grande variedade de estímulos e condições que podem desencadear a apoptose, nem todas as células reagem da mesma maneira em resposta ao mesmo estímulo<sup>144</sup>.

A morte celular por necrose é caracterizada pelo aumento do tamanho dos organelos e do citoplasma, seguido do colapso da membrana e, conseqüentemente, lise celular. A necrose é considerada um tipo de morte não controlada por mecanismos de sinalização, ocorrendo de forma não programada, em condições extremas, e que está associada a processos inflamatórios<sup>145,146</sup>. Contudo, alguns autores afirmam que a necrose, tal como a apoptose, é um tipo de morte controlado e programado<sup>146,147</sup>.

Assim, para avaliar se o tratamento com hAMPE induz morte celular e perceber qual o tipo de morte induzido, foi realizada a técnica de esfregaços com a coloração de May Grünwald-Giemsa. O corante May Grünwald é constituído por eosina, um corante aniónico e por azul-de-metileno um corante catiónico. Por outro lado, Giemsa é constituído por azul-de-metileno e eosina azur. Esta coloração baseia-se na ligação dos corantes catiónicos aos componentes ácidos das células conferindo-lhes uma cor azulada, enquanto os corantes aniónicos vão corar os componentes alcalinos atribuindo-lhes uma cor vermelha-arroxeadada.

Para a realização deste ensaio, as células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE. A avaliação da morfologia celular foi realizada após 24 e 72h de incubação. Para isso, as células foram tripsinizadas e seguidamente centrifugadas a 2500G durante 5 minutos para retirar o meio de cultura. O *pellet* obtido foi ressuspensão em PBS e posteriormente centrifugada a suspensão a 2500G durante 5 minutos para lavagem. Seguidamente as células foram ressuspensas

em 60µL de FBS e foram preparados os esfregaços colocando 20µL de cada suspensão na superfície de uma lâmina e, com o auxílio de outra foi feito o esfregaço. Após fixação durante a noite, as lâminas foram colocadas na horizontal, para permitir uma distribuição mais homogênea dos corantes. A cada lâmina foi adicionado 1,5 mL de solução de Grünwald (Sigma, MG500) durante 3 minutos, seguida de uma lavagem com 1,5 mL de água durante 1 minuto. Após lavagem, foi preparada a solução de Giemsa (Sigma, GS500) e foram adicionados 2,5mL desta solução a cada lâmina. As células foram deixadas a corar durante 15 minutos. Após coloração, as células foram lavadas com água tépida para retirar o excesso dos corantes e foram deixadas secar. As lâminas foram posteriormente visualizadas ao microscópio.

#### **2.4.9 - Terapia combinada**

O carcinoma hepatocelular possui um perfil quimiorresistente e, conseqüentemente, a quimioterapia no CHC tem um papel principalmente paliativo, envolvendo o controlo dos efeitos do crescimento do tumor e a minimização dos sintomas que dele advêm<sup>148</sup>. Contudo, agentes quimioterapêuticos como 5-fluorouracilo (5-FU) (Sigma, F6627), a doxorubicina (Doxo) (Adriamycin®, Hospira Portugal, Lda), a cisplatina (Cis) (P4394, Sigma) e um novo fármaco para terapêutica dirigida às proteínas cinases como o sorafenib<sup>1</sup> (Sora) são utilizados no tratamento deste tipo de tumores. Tendo em conta todo o perfil quimiorresistente dos carcinomas hepatocelulares, pretendeu-se avaliar qual o efeito do tratamento combinado entre cada um dos fármacos e a hAMPE.

Para avaliar os efeitos da combinação dos três agentes quimioterapêuticos referidos e do sorafenib com a hAMPE foi realizado o ensaio de MTT. As células foram tripsinizadas e foi obtida uma suspensão celular de  $5 \times 10^4$  células que foi distribuída em placas de 96 poços. Após 24h, as linhas celulares foram incubadas com hAMPE (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L no caso de HepG2 e HuH7 ou 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ L no caso da linha celular Hep3B2.1-7) e com o IC50 (*concentração* necessária para inibir em 50% a atividade metabólica) de cada fármaco. Os valores dos IC50 utilizados encontram-se indicados na tabela 1. Os valores de IC50 utilizados encontram-se publicados<sup>148, 149</sup>. Nesta experiência foram considerados os veículos de administração dos respectivos fármacos, servindo estes como controlo. Após 72h de incubação foi realizado o ensaio de MTT, como descrito anteriormente.

**Tabela 1** - IC50 dos fármacos utilizados na terapia combinada

	<b>Hep3B 2.1-7</b>	<b>HepG2</b>	<b>HuH7</b>
<b>5 - Fluorouracilo</b>	88,25 $\mu$ M	18,98 $\mu$ M	166,62 $\mu$ M
<b>Doxorrubicina</b>	0,429 $\mu$ M	0,290 $\mu$ M	0,102 $\mu$ M
<b>Cisplatina</b>	2,97 $\mu$ M	2,04 $\mu$ M	1,51 $\mu$ M
<b>Sorafenib</b>	5,27 $\mu$ M	4,96 $\mu$ M	10,62 $\mu$ M



## 2.5 – Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* têm um papel essencial na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no crescimento tumoral. Os estudos *in vivo* constituem um sistema complexo formado por vários tipos de células que interagem com uma rede vascular e um sistema de órgãos que pode levar a alterações no comportamento tumoral.

Para perceber qual o papel do hAMPE no tratamento de carcinomas hepatocelulares *in vivo*, foram realizados estudos utilizando ratinhos *Balb/c nu/nu*. Foi escolhida esta estirpe de ratinhos por serem atímicos, o que implica uma produção deficiente de células T pelo que permite o desenvolvimento de xenotransplantes sem que ocorra rejeição por parte do animal.

Para a realização deste modelo, a inoculação das células foi feita no dorso dos animais, recorrendo por isso a um modelo animal heterotópico (local de inoculação diferente do local original das células tumorais). A utilização deste local para a inoculação celular possui várias vantagens, como por exemplo, uma fácil inoculação das células tumorais, uma fácil monitorização do crescimento e uma área considerável que permite a expansão tumoral. Todas estas vantagens permitem um rápido desenvolvimento e avaliação do crescimento tumoral, permitindo assim averiguar qual o efeito *in vivo* do hAMPE de uma maneira fácil e com um modelo animal simples.

Foram inoculadas  $20 \times 10^6$  células HuH7 no dorso dos ratinhos para obtenção dos xenotransplantes. Durante todo o processo de monitorização foi

avaliada a massa e o volume tumoral (de acordo com a equação 1), bem como qualquer alteração de comportamento e estado geral de saúde dos animais.

$$V = \frac{L_t \times S^2}{2} \quad (\text{equação 1})$$

onde V é o volume,  $L_T$  corresponde ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor<sup>150</sup>.

A terapia com hAMPE foi iniciada quando os tumores atingiram 300mm<sup>3</sup>. Para avaliar o efeito do potencial anti-cancerígeno de hAMPE foram necessários dois grupos de animais, o grupo 1 ou grupo de controlo, cujos animais não foram sujeitos a qualquer tratamento e o grupo 2 o grupo de animais sujeito a terapia com hAMPE.

Os animais pertencentes ao grupo 2 e sujeitos a terapia com hAMPE foram administrados por via intraperitoneal com a concentração de 60 mg/Kg de dois em dois dias, durante doze dias. Após os doze dias de terapia, os animais foram ocisados por deslocamento cervical e as curvas de crescimento tumoral foram construídas.

## 2.6 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® v. 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes paramétricos no caso de se verificar uma distribuição

normal e homogeneidade das variâncias e testes não paramétricos em caso contrário. Considerou-se uma significância igual a 0,05 para todas as comparações.

No ensaio de MTT, SRB e violeta de cristal a comparação dos valores obtidos entre os vários grupos considerados foi realizada de acordo com o teste ANOVA de um fator no caso de existir normalidade da distribuição e homogeneidade das variâncias. No caso de não se verificarem estes pressupostos, foi considerado o teste de Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas foram obtidas segundo a correção de Bonferroni em caso de homogeneidade de variâncias e, em caso contrário, a correção de Games-Howell. Todas estas considerações foram também tomadas em conta na análise dos dados relativos à terapia combinada.

Para avaliar estatisticamente os resultados obtidos através do ensaio cometa, cujo objetivo era comparar a condição controlo com a condição sujeita a incubação com hAMPE, foi considerado o teste de Mann-Whitney.

O mesmo teste foi utilizado para analisar estatisticamente os resultados relativos ao ciclo celular em caso de rejeição da normalidade. Em caso contrário, o teste t de Student para amostras independentes foi considerado. O teste t de Student teste foi também aplicado no tratamento estatístico dos dados obtidos a partir da técnica de western blot.



# *Capítulo 3*

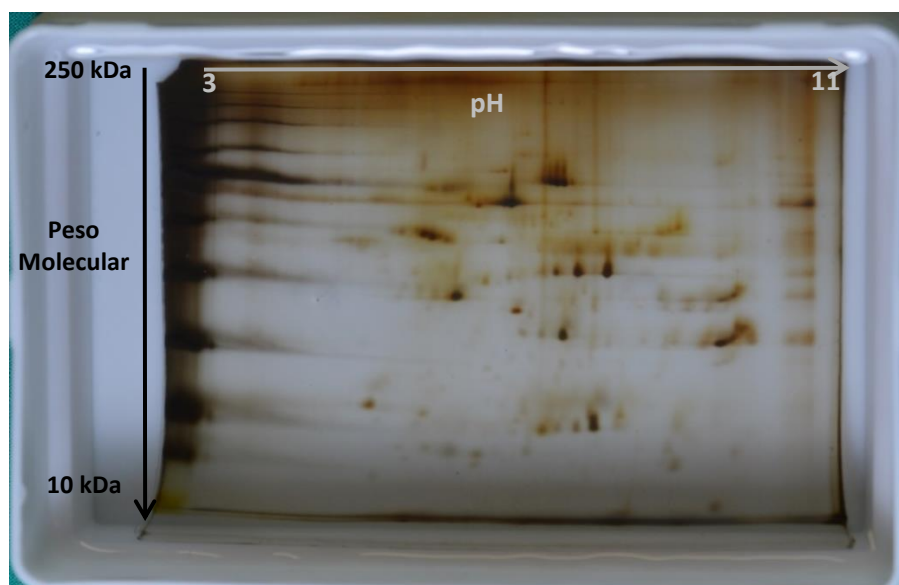
## **RESULTADOS**



Este trabalho tem como principal objetivo o estudo dos mecanismos anti-cancerígenos de hAMPE no carcinoma hepatocelular. Deste modo, foram utilizadas as metodologias descritas anteriormente de forma a analisar se a utilização de hAMPE pode representar uma nova opção terapêutica neste tipo de tumores.

### 3.1 - Caracterização das proteínas da membrana amniótica

Para separar e avaliar qualitativamente a proteína constituinte de hAMPE, de acordo com o seu ponto isoelétrico e com o peso molecular, recorreu-se à técnica de eletroforese 2D e posterior coloração dos géis com nitrato de prata para a deteção das proteínas. A figura 3.1 representa um gel obtido através desta técnica.



**Figura 3.1 - Gel 2D obtido a partir de um hAMPE.** O gel revela o resultado da separação das proteínas constituintes de um hAMPE de acordo o seu ponto isoelétrico (pH entre 3 e 11) e peso molecular (entre 10 e 250 kDa). O gel foi corado com nitrato de prata.

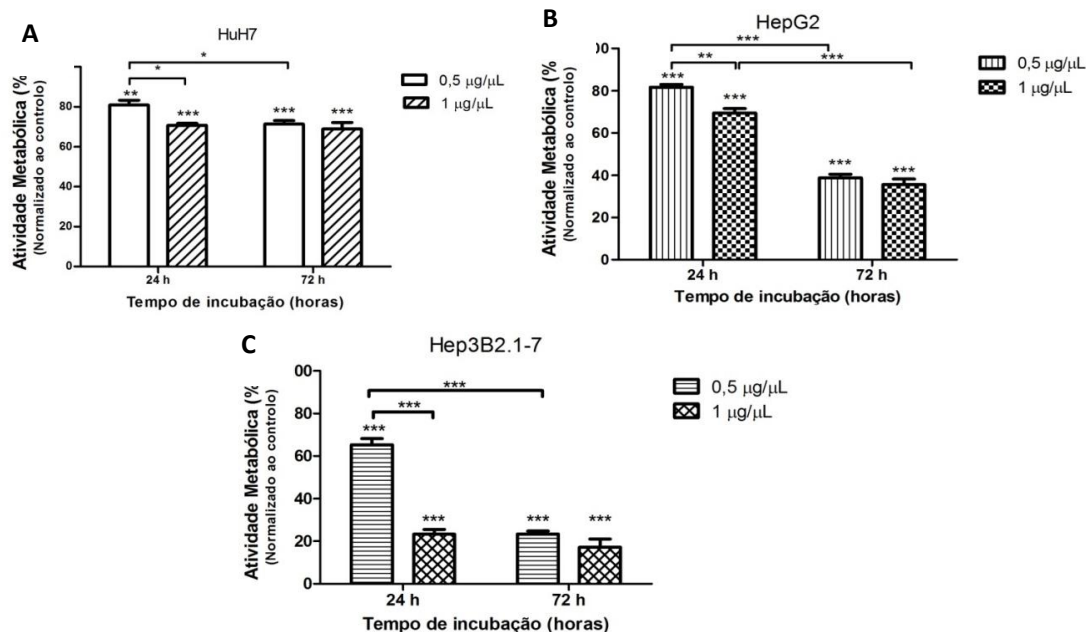
O protocolo de separação das proteínas presentes no hAMPE através da eletroforese 2D foi otimizado. Foram efetuadas várias alterações na programação da focagem isoeétrica bem como modificações nos volumes de determinados reagentes como o tampão de equilíbrio e o óleo mineral, essenciais para o procedimento da focagem isoeétrica. Contudo, após várias otimizações o procedimento final utilizado foi adaptado de um protocolo pré-definido pelo BioRad®<sup>122</sup>.

Observando o gel representado na figura 3.1, é possível verificar que existe uma elevada quantidade de proteínas no hAMPE, possuindo diferentes pontos isoeétricos e diferentes pesos moleculares. É também de notar que as tiras utilizadas, cujo pH variou entre 3 e 11, se revelaram adequadas tendo em conta os valores de pH detetados.

### **3.2 - Avaliação da atividade metabólica**

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações e diferentes períodos de incubação na atividade metabólica dos hAMPE nas linhas celulares de CHC, recorreu-se ao ensaio de MTT. Na figura 3.2 mostram-se um conjunto de gráficos que traduzem o comportamento da atividade metabólica após tratamento com hAMPE nas linhas celulares HuH7 (fig.3.2 A), HepG2 (fig.3.2 B) e Hep3B2.1-72.1-7 (fig.3.2 C) após 24 e 72 horas de incubação com 0.5µg/µL e 1µg/µL de hAMPE.





**Figura 3.2 - Atividade metabólica após tratamento com hAMPE nas linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) obtida pelo ensaio de MTT.** Cada gráfico expressa a percentagem de atividade metabólica obtida relativamente ao controlo e os erros padrão de oito experiências independentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \*, onde \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$ .

Em relação aos resultados obtidos para a linha celular HuH7 (figura 3.2 A) após 24 horas de incubação, verifica-se uma diminuição significativa da atividade metabólica após tratamento com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE ( $p < 0,001$ ) e com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelam uma diminuição significativa da atividade metabólica para valores de 71% e 68% ( $p < 0,001$ ), relativamente às condições  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, respetivamente.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que a atividade metabólica diminui com o aumento da concentração de hAMPE após 24h de incubação. Ou seja, os resultados obtidos,

após 24h de incubação, revelam diferenças significativas ( $p=0,015$ ) entre a atividade metabólica da concentração inferior (81%), e a atividade metabólica da concentração superior (71%). No que diz respeito às 72h de incubação, não se verificaram diferenças significativas entre as duas concentrações avaliadas.

Quando avaliados diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE é possível também observar uma diminuição significativa da atividade metabólica ( $p=0,032$ ), cerca de 10%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas a  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. O mesmo não acontece com as células que são incubadas com uma concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE.

Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular HepG2 (figura 3.2 B) após 24 horas de incubação, verifica-se uma diminuição significativa da atividade metabólica após tratamento com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p<0,001$ ) e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p<0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição significativa da atividade metabólica de 61% e 64% ( $p<0,001$ ), relativamente às condições  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE respetivamente.

Comparando as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que a atividade metabólica diminui com o aumento da concentração após 24h de incubação. Ou seja, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelam diferenças significativas ( $p=0,002$ ) entre a atividade metabólica na concentração inferior (82%), e a atividade metabólica na concentração superior (70%). No que diz respeito às 72h de incubação, não se verificaram diferenças significativas entre as duas concentrações avaliadas.

Quando avaliados diferentes tempos de incubação, 24 e 72h, para a mesma concentração de hAMPE é possível observar uma diminuição significativa da atividade metabólica ( $p < 0,001$ ), cerca de 82%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Similarmente, quando as células são incubadas com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE verificou-se também uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) de aproximadamente 34%.

Em relação aos resultados obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7 (figura 3.2 C) após 24 horas de incubação, verificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica após tratamento com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelam uma diminuição significativa da atividade metabólica para valores de 23% e 17% ( $p < 0,001$ ), relativamente às condições com as concentrações de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  respetivamente.

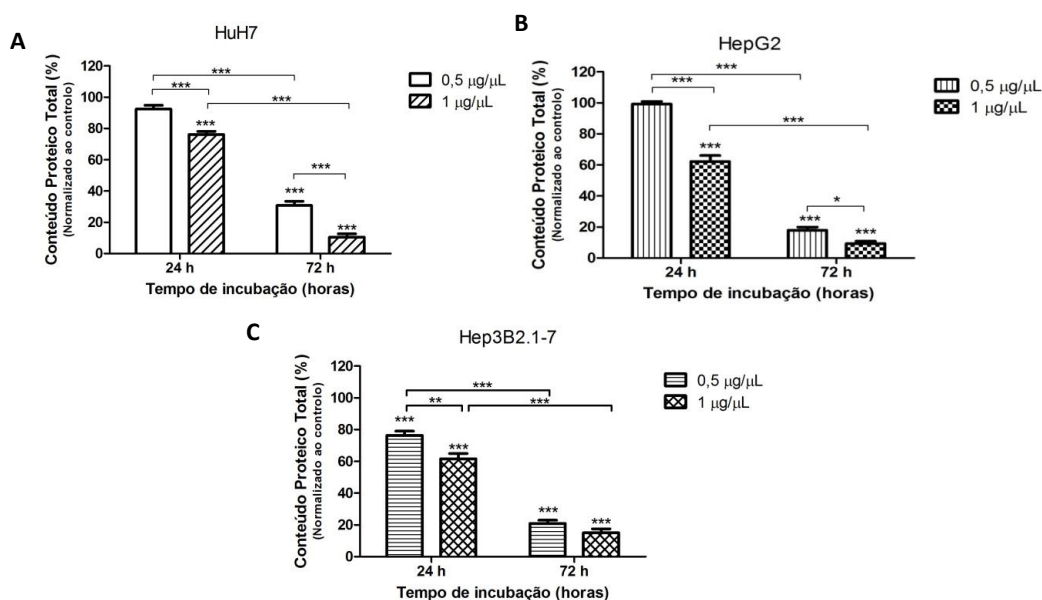
Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que a atividade metabólica diminui com o aumento da concentração de hAMPE após 24h de incubação. Ou seja, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelaram diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre a atividade metabólica da concentração inferior (65%), e a atividade metabólica da concentração superior (23%). No que diz respeito às 72h de incubação, não se verificaram diferenças significativas entre as duas concentrações avaliadas.

Quando avaliados diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE é possível observar uma diminuição significativa da atividade metabólica ( $p < 0,001$ ), cerca de 42%, com o aumento do tempo de

incubação quando as células são expostas à concentração de 0,5µg/µL. O mesmo não acontece com as células são incubadas com a concentração de 1µg/µL de hAMPE.

### 3.3 - Avaliação do conteúdo proteico total

Para avaliar o efeito de hAMPE no conteúdo proteico total das linhas de CHC, as culturas celulares foram incubadas com concentrações de 0,5µg/µL e de 1µg/µL. Na figura 3.3 podemos visualizar os gráficos correspondentes à avaliação do conteúdo proteico após tratamento com hAMPE nas linhas celulares HuH7 (fig.3.3 A), HepG2 (figx.3.3 B) e Hep3B2.1-7 (fig.3.3 C) após 24 e 72 horas de incubação.



**Figura 3.3 - Conteúdo proteico total após tratamento com hAMPE nas linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) obtido através do ensaio de sulforrodamina B.** Cada gráfico expressa a percentagem de conteúdo proteico total obtido relativamente ao controlo e os erros padrão de oito experiências independentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \*, em que \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$ .

Considerando os resultados obtidos para a linha celular HuH7 (figura 3.3 A) após 24 horas de incubação, verifica-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico total apenas após tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. De evidenciar ainda que em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição significativa do conteúdo proteico total para valores de 31% e 11% ( $p < 0,001$ ), relativamente às condições de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respetivamente.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que o conteúdo proteico total diminuiu com o aumento da concentração após 24 h de incubação. Isto é, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelam diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre o conteúdo proteico total com a concentração inferior (92%), e a e o conteúdo proteico total com a concentração superior (76%). No que diz respeito às 72h de incubação, verificaram-se de igual modo diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre as duas concentrações avaliadas.

Quando avaliados os diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE foi possível observar uma diminuição significativa do conteúdo proteico ( $p < 0,001$ ), cerca de 61%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de hAMPE de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para a incubação com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , observou-se uma diminuição, com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ), com o aumento do tempo de incubação, onde se obteve uma diminuição de cerca de 66% no conteúdo proteico total entre as 24h e 72h de incubação.

Em relação aos resultados obtidos para a linha celular HepG2 (figura 3.3 B) após 24 horas de incubação, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico total apenas após tratamento com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p<0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição significativa do conteúdo proteico total, para valores de 18% e de 9% ( $p<0,001$ ), relativamente às condições de concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respetivamente.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que o conteúdo proteico total diminuiu com o aumento da concentração às 24h de incubação. Isto é, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelaram diferenças significativas ( $p<0,001$ ) entre o conteúdo proteico total com a exposição à concentração inferior (99%), e o conteúdo proteico total com a exposição à concentração superior (63%). No que diz respeito às 72h de incubação verificaram-se, de igual modo, diferenças significativas ( $p=0,02$ ) entre as duas concentrações avaliadas.

Quando avaliados os diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE foi possível observar uma diminuição significativa do conteúdo proteico ( $p<0,001$ ), cerca de 81%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para a incubação com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , observou-se uma diminuição, com diferenças significativas ( $p<0,001$ ), com o aumento do tempo de incubação, onde se obteve uma diminuição de cerca de 54% no conteúdo proteico total entre as 24h e 72h de incubação.

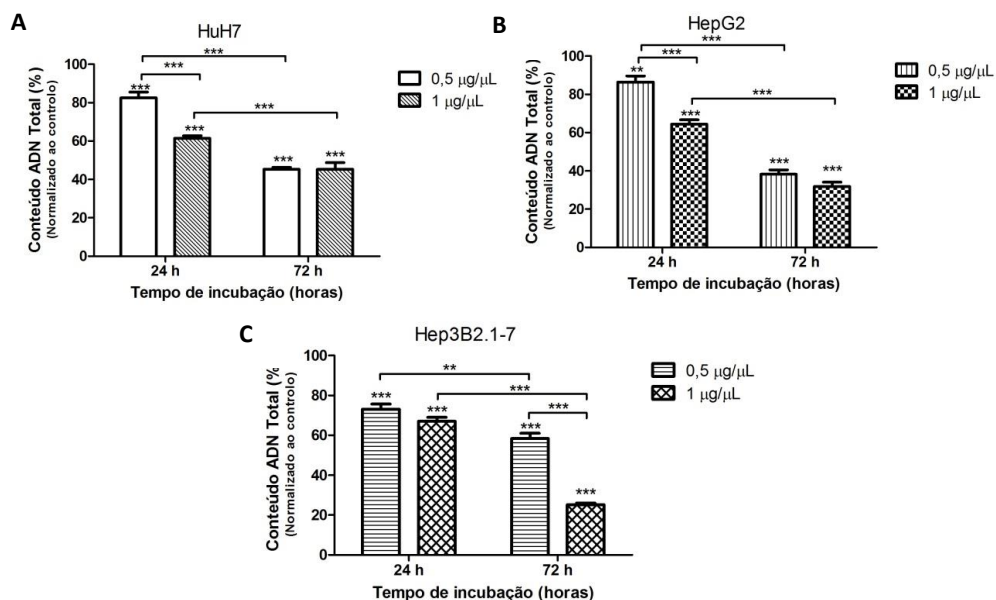
Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7 (figura 3.3 C) após 24 horas de incubação, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico total apenas após tratamento com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda relativamente controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição significativa do conteúdo proteico total de 77% e 89% ( $p < 0,001$ ), relativamente às incubações com as concentrações de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respetivamente.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que conteúdo proteico total diminuiu com o aumento da concentração de hAMPE após 24h de incubação. Ou seja, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelaram diferenças significativas ( $p = 0,004$ ) entre o conteúdo proteico total com a concentração inferior (76%), e o conteúdo proteico total com a concentração superior (61%). No que diz respeito às 72h de incubação, não se verificaram diferenças significativas entre as duas concentrações avaliadas.

Quando avaliados os diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE foi possível observar uma diminuição significativa do conteúdo proteico ( $p < 0,001$ ), cerca de 55%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para a incubação com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , observou-se uma diminuição, com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ), com o aumento do tempo de incubação, onde se obteve uma diminuição de cerca de 47% no conteúdo proteico com o aumento do tempo de incubação.

### 3.4 - Avaliação do conteúdo em ácido desoxirribonucleico total

Neste trabalho avaliou-se o efeito do hAMPE no conteúdo de ADN total nas linhas celulares de CHC. Para tal, as culturas celulares foram incubadas com as concentrações de 0,5µg/µL e de 1µg/µL hAMPE. Os gráficos representados na figura 3.4, expressam o conteúdo de ADN total obtido após os tratamentos com hAMPE nas linhas celulares HuH7 (fig.3.4 A), HepG2 (fig3.4. B) e Hep3B2.1-7 (fig.3.4 C) após 24 e 72 horas de incubação.



**Figura 3.4 - Conteúdo de ADN total após tratamento com hAMPE nas linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) obtido através do ensaio de violeta de cristal. Cada gráfico expressa a percentagem de conteúdo de ADN total obtido relativamente ao controlo e os erros padrão de oito experiências independentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \*, em que \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$ .**

Em relação aos resultados obtidos com a linha celular HuH7 (figura 3.4 A) após 24 horas de incubação, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo total de ADN após tratamento com 0,5µg/µL ( $p < 0,001$ ) e com 1µg/µL ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição



significativa do conteúdo de ADN para valores de 45% ( $p < 0,001$ ) para as condições de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que conteúdo total de ADN diminuiu com o aumento da concentração após 24h de incubação. Assim, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelaram diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre o conteúdo proteico total com a concentração inferior (83%), e o conteúdo proteico total com a concentração superior (61%). No que diz respeito às 72h de incubação, não se verificaram diferenças significativas.

Quando avaliados os diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE foi possível observar uma diminuição significativa do conteúdo proteico ( $p < 0,001$ ), cerca de 37%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Quando a incubação se realizou com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , observou-se uma diminuição, com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ), com o aumento do tempo de incubação, onde se obteve uma diminuição de cerca de 16% no conteúdo total de ADN com o aumento do tempo de incubação.

Em relação aos resultados obtidos para a linha celular HepG2 (figura 3.4 B) após 24 horas de incubação, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo total de ADN após tratamento com a concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p = 0,02$ ) e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição significativa do conteúdo de ADN para valores de 38% e de 32% ( $p < 0,001$ ) relativamente às condições de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que conteúdo total de ADN diminuiu com o aumento da concentração às 24h de incubação. Assim, os resultados obtidos, após 24h de incubação, revelaram diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre o conteúdo proteico total na concentração inferior (86%), e o conteúdo proteico total na concentração superior (64%). No que diz respeito às 72h de incubação, não se verificaram diferenças significativas.

Quando analisados os diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE foi possível observar uma diminuição significativa do conteúdo proteico ( $p < 0,001$ ), cerca de 49%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para a incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, observou-se uma diminuição, com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ), com o aumento do tempo de incubação, onde se observou uma diminuição de cerca de 33% no conteúdo total de ADN com o aumento do tempo de incubação.

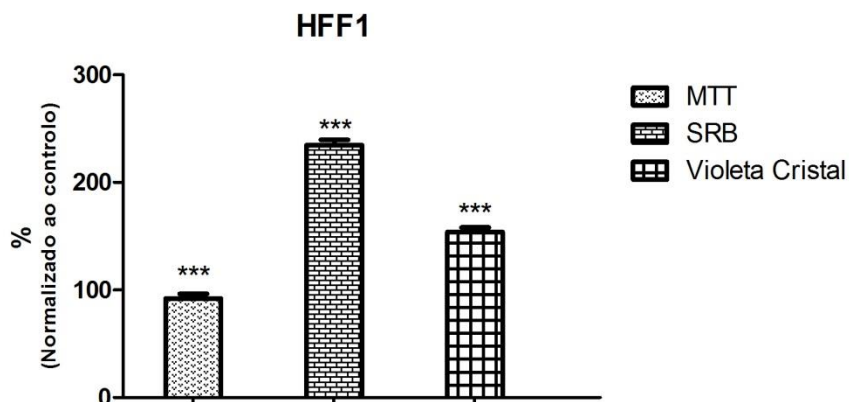
Em relação aos resultados obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7 (figura 3.4 C) após 24 horas de incubação, verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo total de ADN após tratamento com a concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,001$ ) de hAMPE em relação ao controlo. Ainda em relação ao respetivo controlo, os resultados obtidos após 72 horas de incubação revelaram uma diminuição significativa do conteúdo de ADN para valores de 58% e de 25% ( $p < 0,001$ ) relativamente às condições de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE.

Quando comparadas as diferentes concentrações para o mesmo tempo de incubação verificou-se que conteúdo total de ADN após 24h de incubação não tinha diferenças significativas entre as concentrações. Às 72h o conteúdo total de ADN diminui com o aumento da dose. Assim, os resultados obtidos, após 72h de incubação, revelaram diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre o conteúdo proteico total na concentração inferior (58%), e o conteúdo proteico total na concentração superior (25%).

Quando analisados os diferentes tempos de incubação para a mesma concentração de hAMPE foi possível observar uma diminuição significativa do conteúdo proteico ( $p < 0,001$ ), cerca de 15%, com o aumento do tempo de incubação quando as células são expostas à concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para a incubação com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , observou-se uma diminuição com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) com o aumento do tempo de incubação, onde se verificou uma diminuição de cerca de 42% no conteúdo total de ADN com o aumento do tempo de incubação.

### **3.5 - Avaliação de atividade metabólica, conteúdo proteico total e conteúdo de ADN total na linha HFF1**

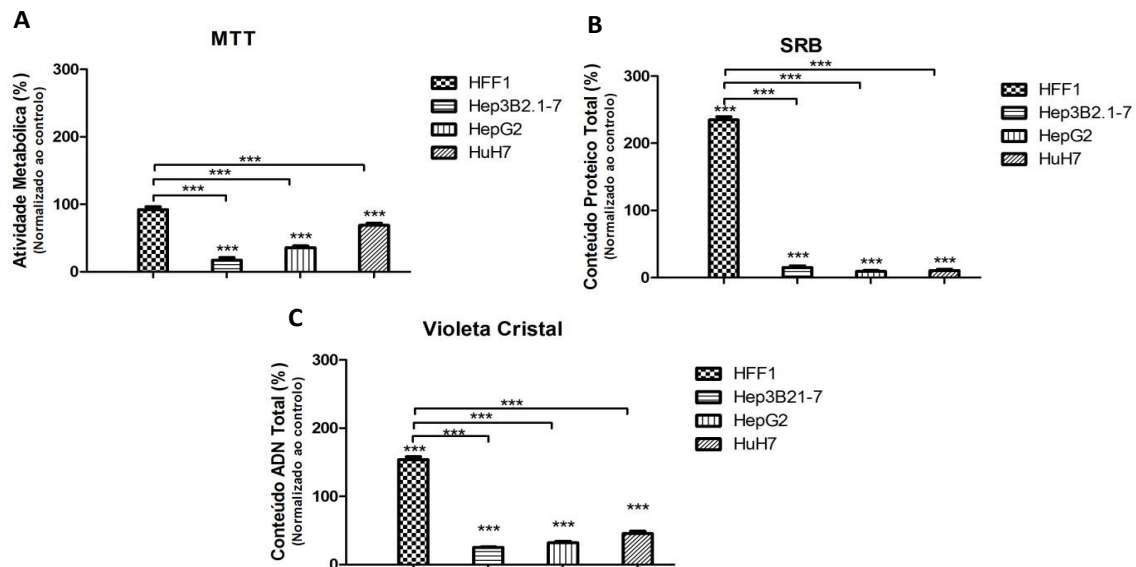
Durante o trabalho desenvolvido avaliou-se o efeito do hAMPE numa linha celular não tumoral, a linha celular normal denominada por HFF1, e que é uma linha celular de fibroblastos. Para tal, avaliou-se a atividade metabólica, o conteúdo proteico total e o conteúdo de ADN total da linha celular HFF1 cujos resultados estão apresentados na figura 3.5.



**Figura 3.5 - Avaliação dos efeitos do hAMPE na linha celular normal HFF1, através do ensaio de MTT, SRB e Violeta de Cristal.** No gráfico encontram-se expressas as percentagens da atividade metabólica (MTT), do conteúdo proteico total (SRB) e do conteúdo de ADN total (violeta de cristal) obtidos relativamente ao controlo e os erros padrão de oito experiências independentes obtidas de quatro membranas diferentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \*, em que \*\*\* representa  $p < 0,001$ .

Relativamente à atividade metabólica verificou-se que a incubação com hAMPE não possui qualquer efeito, não alterando a atividade metabólica em relação ao controlo (fig. 3.5, A). No que diz respeito ao conteúdo proteico, a incubação com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE promove um aumento significativo ( $p=0,001$ ) da síntese proteica relativamente ao controlo (fig. 3.5, B). Por fim, quando avaliado o conteúdo de DNA, através da técnica de violeta de cristal, verificou-se que a incubação com hAMPE também aumenta significativamente o conteúdo de ADN total ( $p < 0,001$ ) em relação ao controlo (fig. 3.5, C).

Todos estes parâmetros avaliados na linha celular HFF1 foram comparados com os já obtidos para as diferentes linhas celulares de CHC, nas mesmas condições, ou seja para a mesma concentração de hAMPE e o mesmo tempo de incubação (fig. 3.6)



**Figura 3.6 – Atividade metabólica (A), conteúdo proteico total (B) e conteúdo de DNA total (C) após tratamento com hAMPE nas linhas celulares HFF1, Hep3B2.1-7, HepG2 e HuH7.** Cada gráfico expressa a percentagem de atividade metabólica, em conteúdo proteico total e em conteúdo de ADN total obtido relativamente ao controlo e os erros padrão de oito experiências independentes obtidas de quatro membranas diferentes.

Em relação aos resultados obtidos através do ensaio de MTT (figura 3.6 A), é possível verificar que a atividade metabólica da linha celular HFF1 foi superior à das linhas celulares de CHC, tendo-se verificado diferenças significativas entre a linha celular normal e as linhas celulares de CHC, como a linha Hep3B ( $p=0,001$ ), a linha HepG2 ( $p=0,001$ ) e a linha HuH7 ( $p=0,001$ ).

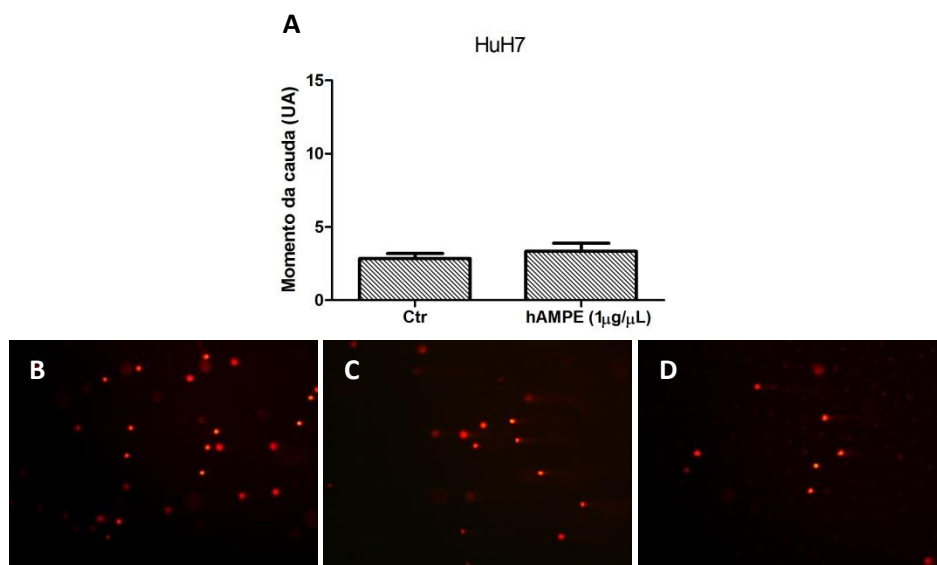
Observando os resultados expressos na figura 3.6 B, é possível verificar que o conteúdo proteico total da linha celular HFF1 aumentou significativamente após o tratamento com hAMPE, comparativamente com as restantes linhas celulares tais como a linha Hep3B ( $p=0,001$ ), a linha HepG2 ( $p=0,001$ ) e a linha HuH7 ( $p=0,001$ ).

Por último, na figura 3.6 C, verifica-se que existe um aumento estatisticamente significativo ( $p<0,001$ ) do conteúdo de ADN total na linha celular

HFF1 em relação ao conteúdo das restantes linhas celulares de CHC, como a linha Hep3B ( $p=0,001$ ), a linha HepG2 ( $p=0,001$ ) e a linha HuH7 ( $p=0,001$ ).

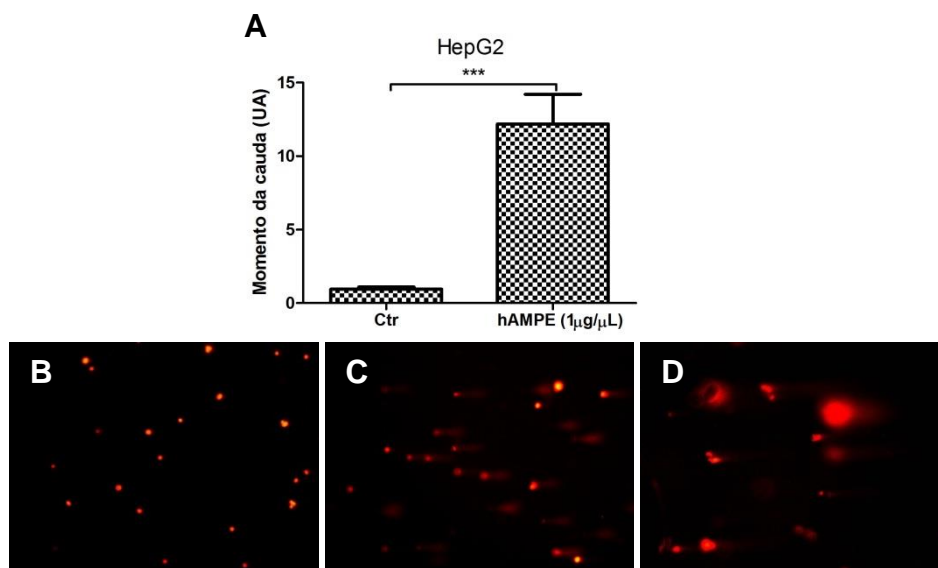
### 3.6 - Avaliação de danos no ADN através do ensaio cometa

Com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com hAMPE nos danos de ADN nas linhas celulares de CHC, realizou-se o ensaio cometa. Os gráficos representados na figura 3.7, 3.8 e 3.9 revelam o momento da cauda após tratamento com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE nas linhas celulares HuH7 (fig.3.7), HepG2 (fig.3.8) e Hep3B2.1-7 (fig.3.9), após 72h de incubação.



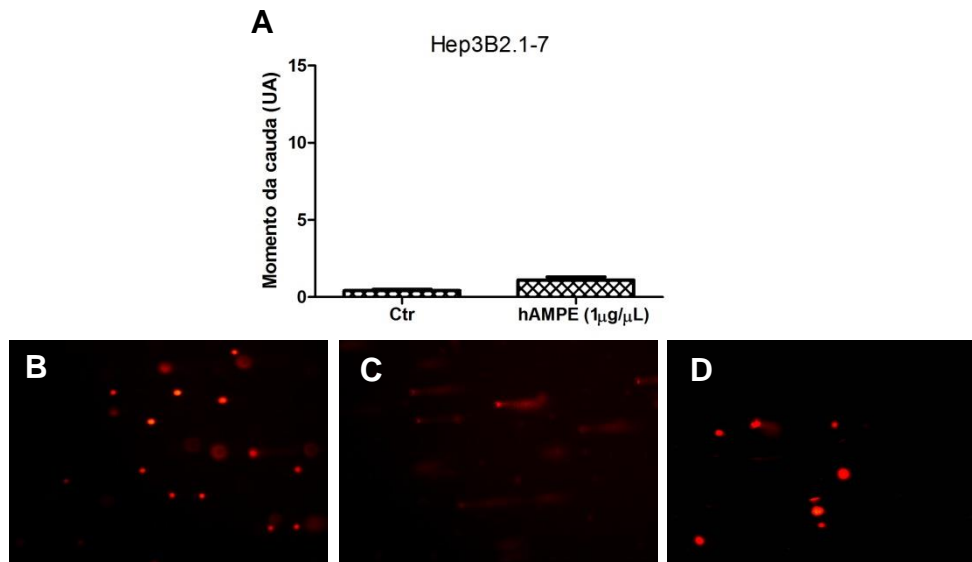
**Figura 3.7 - Avaliação de danos no ADN recorrendo ao ensaio cometa para a linha celular HuH7.** Representação gráfica dos resultados obtidos relativamente ao momento da cauda (A); imagens ilustrativas dos cometas obtidos no (B) controlo negativo (células não tratadas), (C) no controlo positivo com peróxido de hidrogénio (20nM) e (D) nas células tratadas com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72h. Os resultados em (A) exprimem a média e o erro padrão de três experiências independentes obtidas a partir de três membranas amnióticas diferentes.

Através dos resultados representados na figura 3.7 verifica-se que não existem alterações significativas do momento de cauda na linha celular HuH7 após tratamento com hAMPE.



**Figura 3.8 - Avaliação de danos no ADN recorrendo ao ensaio cometa para a linha celular HepG2.** Representação gráfica dos resultados obtidos relativamente ao momento da cauda (A); imagens ilustrativas dos cometas obtidos no (B) controlo negativo (células não tratadas), (C) no controlo positivo com peróxido de hidrogénio (20nM) e (D) nas células tratadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72h. Os resultados em (A) exprimem a média e o erro padrão de três experiências independentes obtidas a partir de três membranas amnióticas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \* onde \*\*\* representa  $p < 0,001$ .

Observando os resultados expressos na figura 3.8, é possível verificar que na linha celular HepG2 existe um aumento significativo ( $p < 0,001$ ), de cerca de treze vezes, do momento da cauda das células incubadas com hAMPE em relação ao respetivo controlo.



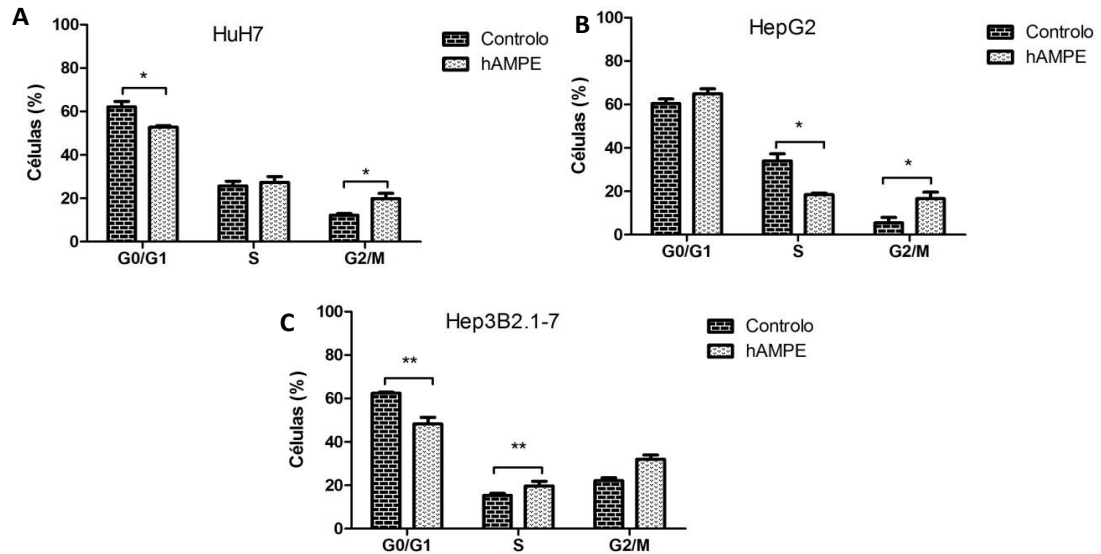
**Figura 3.9 - Avaliação de danos no ADN recorrendo ao ensaio cometa para a linha celular Hep3B2.1-7.** Representação gráfica dos resultados obtidos relativamente ao momento da cauda (A); imagens ilustrativas dos cometas obtidos no (B) controlo negativo (células não tratadas), (C) no controlo positivo com peróxido de hidrogénio (20nM) e (D) nas células tratadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72h. Os resultados em (A) exprimem a média e o erro padrão de três experiências independentes obtidas a partir de três membranas amnióticas diferentes.

Através dos resultados representados na figura 3.9, verifica-se que não existem alterações significativas no momento de cauda da linha celular Hep3B2.1-7 após incubação com hAMPE, em relação ao respetivo controlo.

### 3.7 - Avaliação do ciclo celular

Para avaliar as possíveis alterações no ciclo celular após tratamento com hAMPE, as linhas celulares de CHC foram incubadas com a concentração de 1µg/µL durante 72h. A figura 3.10 representa a percentagem de células presentes em cada uma das fases do ciclo celular para as linhas celulares de CHC estudadas com as HuH7 (fig.3.6 A), as HepG2 (fig.3.6 B) e as Hep3B2.1-7 (fig.3.6 C).





**Figura 3.10 – Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídeo e RNase para as linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C).** Na figura estão representadas as populações celulares em fase G0/G1, em fase S e fase G2/M. Os resultados expressam a percentagem de células em cada fase do ciclo celular e exprimem a média e o erro padrão de três experiências independentes obtidas a partir de três membranas amnióticas diferentes. As diferenças significativas em relação ao controlo estão assinaladas com \*, e \* representa  $p < 0,05$  e \*\* representa  $p < 0,01$ .

Através dos resultados obtidos para a linha celular HuH7 (fig. 3.10, A) verificou-se uma diminuição significativa da população celular em fase G0/G1 para a condição controlo e a incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE ( $p=0,021$ ). Observou-se também que a população em fase S, relativamente ao controlo, não sofreu qualquer alteração. Verificou-se ainda que ocorre um aumento significativo da população em fase G2/M entre a condição controlo e a incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE ( $p=0,036$ ).

Na linha celular HepG2 (fig. 3.10, B), não se verificaram alterações na população em fase G0/G1 após tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE na linha celular. Relativamente à população em fase S, verificou-se uma diminuição significativa da população de células tratadas (17%) em relação à população controlo (34%) ( $p=0,01$ ). É ainda possível observar que existiu um aumento

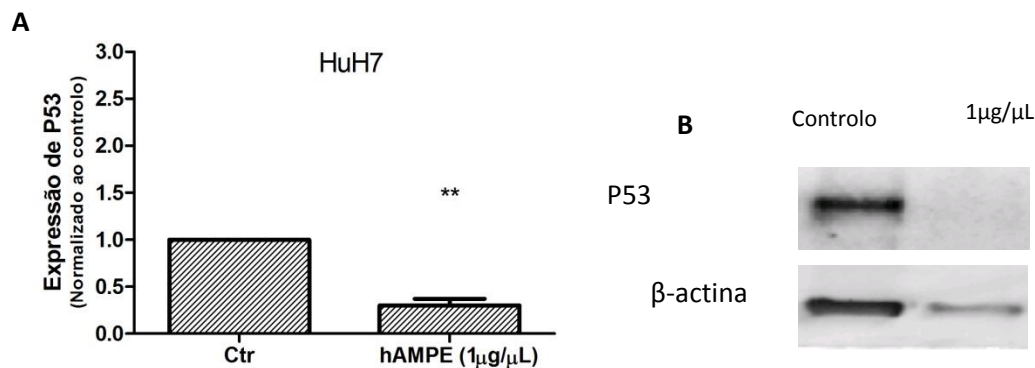
significativo ( $p=0,05$ ) de cerca de 12% da população celular na fase G2/M após tratamento.

Relativamente à linha celular Hep3B2.1-7 (fig. 3.10,C), é possível observar que o tratamento com hAMPE levou a uma diminuição significativa ( $p=0,009$ ) de 62% de células em fase G0/G1 na condição controlo relativamente a 14% da população de células na fase G0/G1 após tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Observa-se também uma diferença estatisticamente significativa da população em fase S, o que se traduz por um aumento de 5% da percentagem de células tratadas relativamente ao controlo ( $p=0,001$ ). Por último, é também possível verificar que não existem alterações na população celular em fase G2/M.

### **3.8 - Avaliação da expressão de P53 e de $\beta$ -catenina através de western blot**

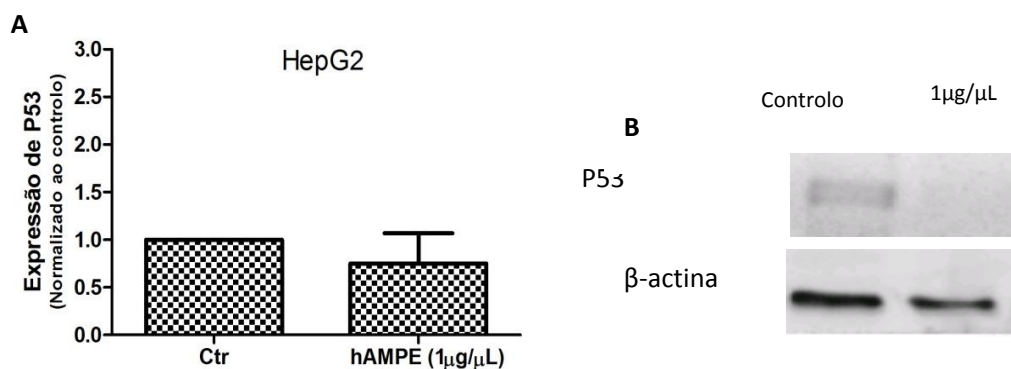
#### **3.8.1 - Expressão de P53**

Neste trabalho foi avaliada a expressão da proteína P53 após o tratamento com hAMPE. Para tal, as linhas celulares de CHC foram incubadas com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  durante 72 h. Os gráficos da figura 3.11, 3.12 e 3.13 representam os resultados obtidos para as linhas celulares HuH7 (3.11), HepG2 (fig.3.12) e Hep3B2.1-7 (fig.3.13).



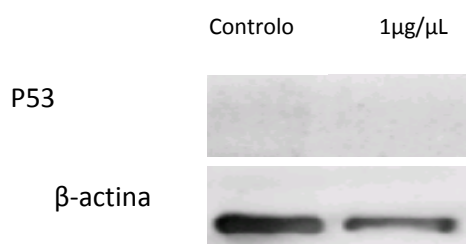
**Figura 3.11 - Avaliação da expressão da proteína P53 por *western blot* na linha celular HuH7.** (A) o gráfico representa a expressão da proteína p53 sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo (razão de intensidade do controlo igual a 1), apresentando a média e o erro padrão de quatro experiências diferentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. (B) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

Através da análise do gráfico da figura 3.11 (A), podemos observar uma diminuição da expressão da proteína P53 após o tratamento com hAMPE ( $p=0,002$ ) relativamente ao controlo. Na figura 3.11 (B), encontra-se representado um *immunoblot* ilustrativo da expressão de P53 e de  $\beta$ -actina para cada uma das condições consideradas.



**Figura 3.12 - Avaliação da expressão da proteína P53 por *western blot* na linha celular HepG2.** (A) o gráfico representa a expressão da proteína P53 sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de P53 e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo (razão de intensidade do controlo igual a 1), apresentando a média e erro padrão de seis experiências independentes obtidas a partir de seis membranas amnióticas diferentes. (B) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

Através da análise do gráfico da figura 3.12 (A), podemos observar uma diminuição da expressão da proteína P53 após o tratamento com 1µg/µL de hAMPE, relativamente ao controlo, ainda que constituam resultados preliminares. Na figura 3.12 (B), encontra-se representado um *immunoblot* ilustrativo da expressão de P53 e de β-actina, para cada uma das condições consideradas.

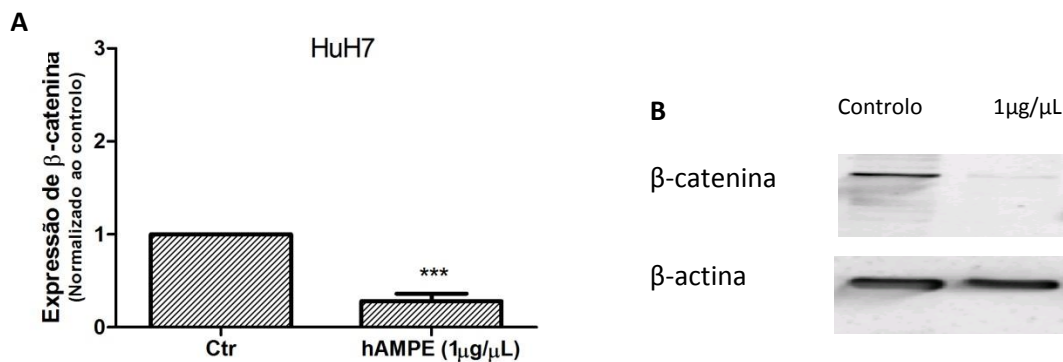


**Figura 3.13 - Avaliação da expressão da proteína P53 por *western blot* na linha celular Hep3B2.1-7.** (A) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína P53 e da β-actina para cada uma das condições experimentais. Os resultados representados foram obtidos a partir de duas experiências independentes obtidos a partir de duas membranas amnióticas diferentes.

Através da análise do *immunoblot* representado na figura 3.13 verifica-se que a linha celular Hep3B2.1-7 não expressa a proteína P53.

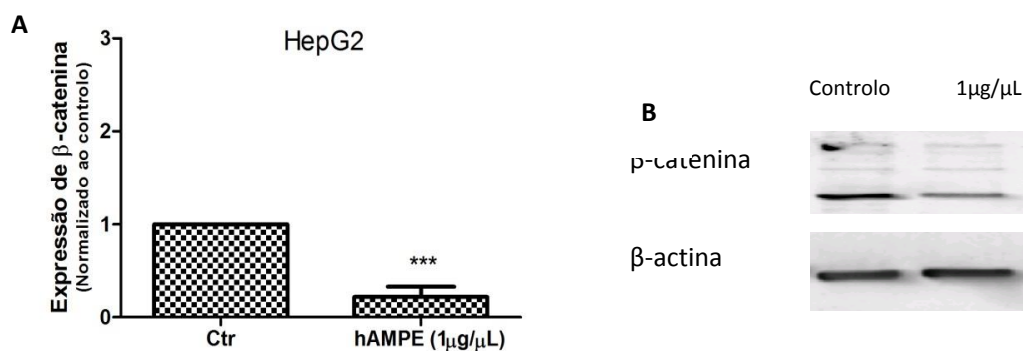
### 3.8.2 - Expressão de β-catenina

Neste trabalho foi avaliada a expressão da proteína β-catenina após o tratamento com hAMPE. Para avaliar possíveis alterações na expressão desta proteína, as linhas de CHC foram incubadas com 1µg/µL durante 72 horas. Os gráficos da figura 3.14, 3.15 e 3.16 representam os resultados obtidos para as linhas celulares HuH7 (3.14), HepG2 (fig.3.15) e Hep3B2.1-7 (fig.3.16).



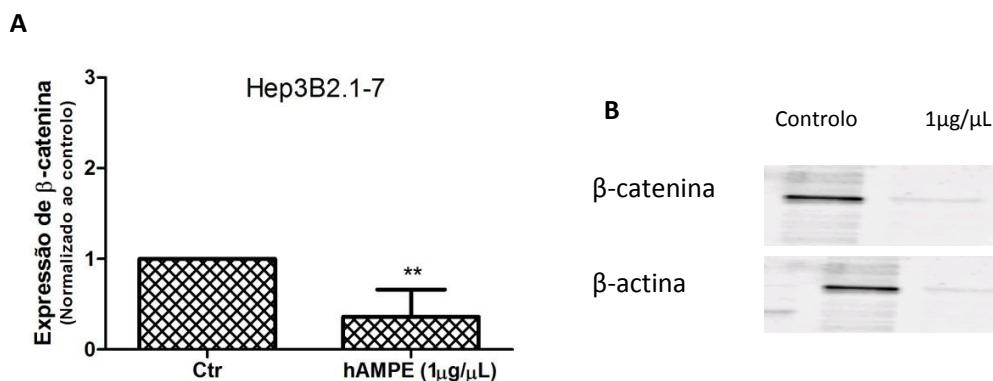
**Figura 3.14 - Avaliação da expressão da proteína  $\beta$ -catenina por *western blot* na linha celular HuH7.** (A) o gráfico representa a expressão da proteína  $\beta$ -catenina sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de  $\beta$ -catenina e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controlo (razão de intensidade do controlo igual a 1), apresentando a média e o erro padrão de quatro experiências independentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. (B) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína  $\beta$ -catenina e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

Observando os resultados expressos no gráfico da figura 3.14 (A), podemos observar uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da expressão da proteína  $\beta$ -catenina após o tratamento com 1 $\mu$ g/ $\mu$ L de hAMPE. Através da figura 3.14 (B), é possível observar um *immunoblot* ilustrativo da expressão de  $\beta$ -catenina e de  $\beta$ -actina, para as condições de controlo e tratamento com 1 $\mu$ g/ $\mu$ L de hAMPE durante 72 horas.



**Figura 3.15 - Avaliação da expressão da proteína  $\beta$ -catenina por *western blot* na linha celular HepG2.** (A) o gráfico representa a expressão da proteína  $\beta$ -catenina sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de  $\beta$ -catenina e a intensidade de fluorescência da actina, normalizada em relação ao controlo (razão de intensidade do controlo igual a 1), apresentando a média e o erro padrão de quatro experiências independentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. (B) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína  $\beta$ -catenina e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

Na linha celular HepG2 (figura 3.15) é possível observar através do gráfico (A) que o tratamento com 1µg/µL de hAMPE induz uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da expressão de  $\beta$ -catenina. Observando o *immunoblot* representado na figura 3.15 (B) é possível verificar a diminuição da expressão de  $\beta$ -catenina quando as células são tratadas com hAMPE.

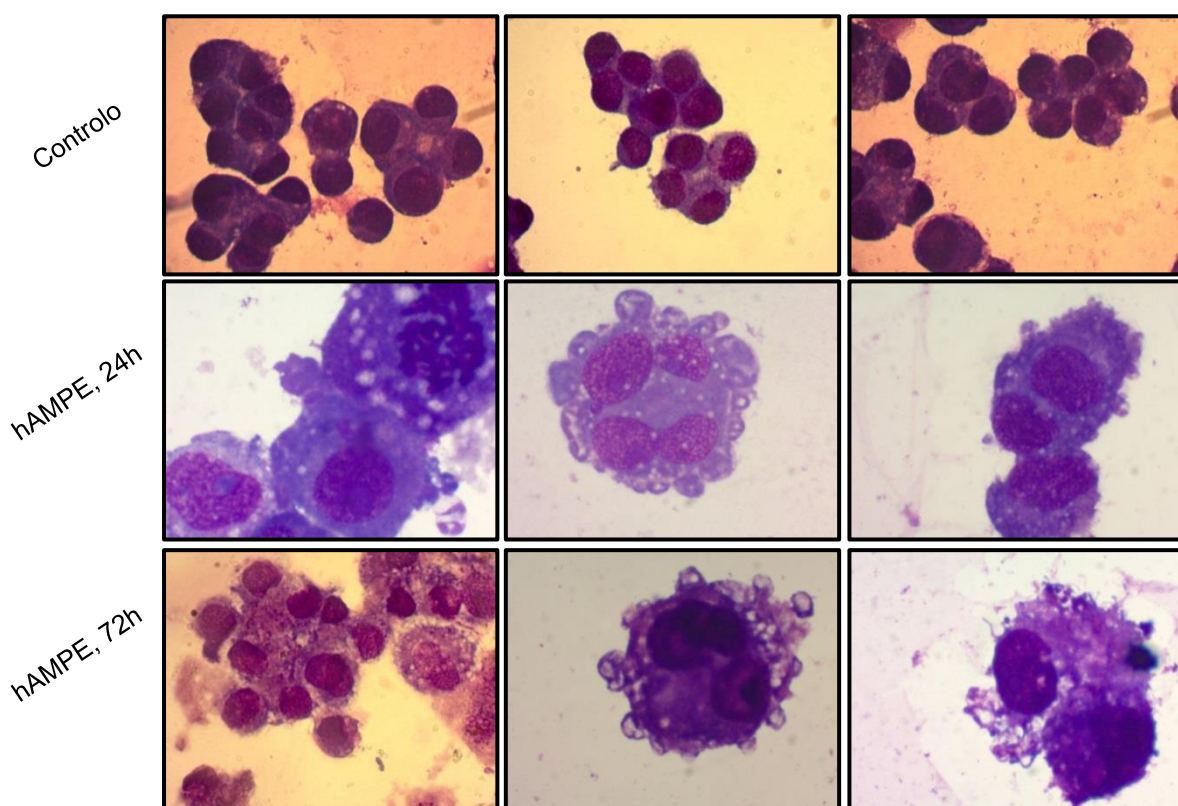


**Figura 3.16 - Avaliação da expressão da proteína  $\beta$ -catenina por *western blot* na linha celular Hep3B2.1-7.** (A) o gráfico representa a expressão da proteína  $\beta$ -catenina sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência de  $\beta$ -catenina e a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -actina, normalizada em relação ao controle (razão de intensidade do controle igual a 1), apresentando a média e o erro padrão de cinco experiências independentes obtidas a partir de cinco membranas amnióticas diferentes. (B) *Immunoblot* ilustrativo da expressão da proteína  $\beta$ -catenina e da  $\beta$ -actina para cada uma das condições experimentais.

No gráfico (A) da figura 3.16 é possível observar uma diminuição da expressão de  $\beta$ -catenina na linha celular Hep3B2.1-7 após incubação com 1µg/µL de hAMPE. Esta incubação constitui um decréscimo estatisticamente significativo relativamente ao controle ( $p=0,002$ ). Observando também o *immunoblot* presente na figura 3.16 (B), é possível verificar a diminuição da expressão de  $\beta$ -catenina após tratamento com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas.

### 3.9 - Avaliação da morte celular

Para a avaliação do tipo de morte celular foi realizada uma análise morfológica recorrendo a esfregaços corados. Esta técnica permite avaliar morfológicamente as diferentes características inerentes a cada um dos tipos de morte celular. Para a realização dos esfregaços, as linhas celulares de CHC foram incubadas com a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  durante 24 e 72 horas. As figuras 3.17, 3.18 e 3.19 representam os resultados obtidos para as linhas celulares HuH7 (3.17), HepG2 (fig.3.18) e Hep3B2.1-7 (fig.3.19), após coloração de May Grünwald-Giemsa.



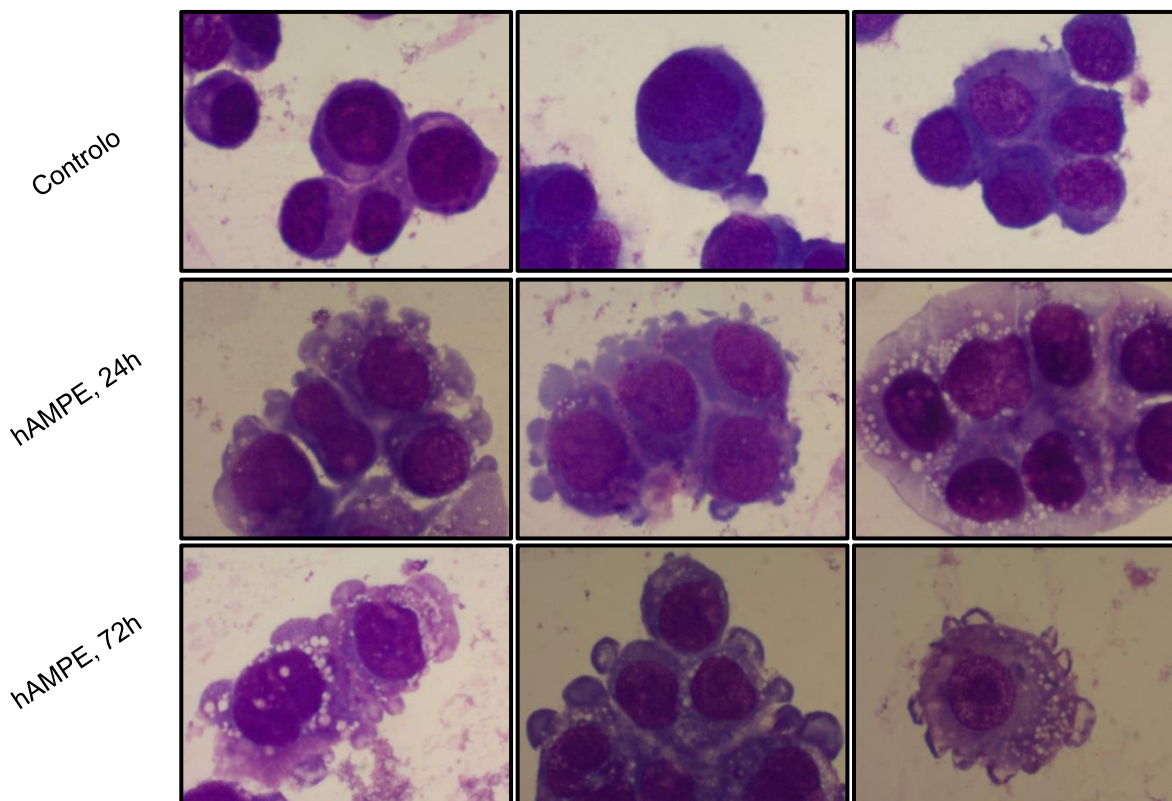
**Figura 3.17 – Avaliação morfológica da morte celular, através da técnica de esfregaços, na linha celular HuH7.** Imagens ilustrativas da condição controlo, incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 24 e incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Experiência repetida três vezes, utilizando para tal três membranas amnióticas diferentes. As imagens foram tiradas aleatoriamente por toda a lâmina, sendo escolhidas imagens representativas da situação geral observada em cada condição.

Analisando as imagens representadas na figura 3.17, verifica-se que a população de células controlo apresenta um elevado número de agregados, sendo o tamanho das células homogêneo. A maioria das células presentes no controlo apresenta uma elevada viabilidade.

Relativamente às imagens representativas do tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 24 horas, estas revelam um aumento do número de células não viáveis relativamente à população controlo. Pode também observar-se a formação de um elevado número de *blebs* e também uma elevada vacuolização.

Após 72 horas de incubação, e à semelhança do comportamento celular observado após 24 horas de incubação com hAMPE, é possível observar uma diminuição do número de células viáveis. Mantém-se predominante a vacuolização citoplasmática e a formação de *blebs* e também de notar que existe um aumento de morte celular por necrose, verificando-se rebentamento citoplasmático.





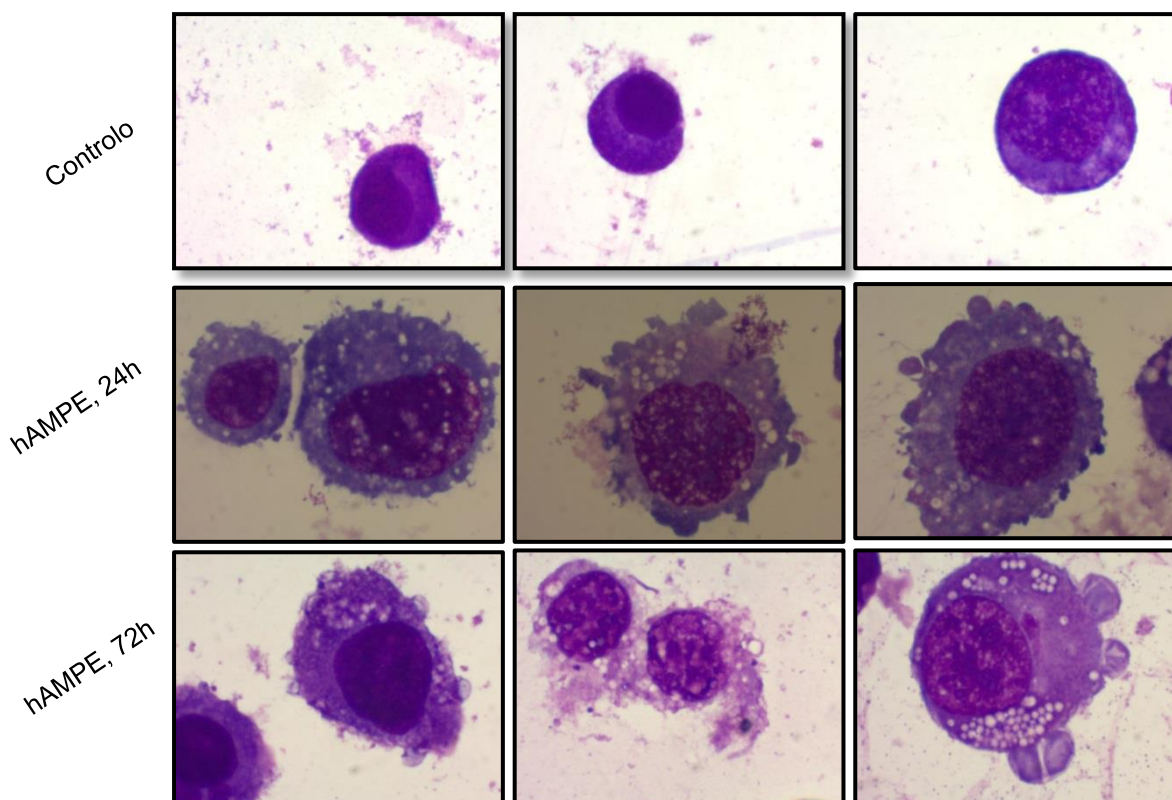
**Figura 3.18 – Avaliação morfológica da morte celular, através da técnica de esfregaços, na linha celular HepG2.** Imagens ilustrativas da condição controlo, incubação com 1µg/µL de hAMPE durante 24 e incubação com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Experiência repetida três vezes, utilizando para tal três membranas amnióticas diferentes. As imagens foram tiradas aleatoriamente por toda a lâmina, sendo escolhidas imagens representativas da situação geral observada em cada condição.

Através da figura 3.18, relativa à linha celular HepG2, verifica-se que existe um elevado número de agregados na população controlo. As células apresentam um núcleo de elevado tamanho e revelam uma elevada viabilidade.

Observando as imagens relativas ao tratamento após 24 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE, observa-se uma elevada formação de vacúolos, assim como também uma elevada formação de *blebs*.

Por último, através das imagens relativas ao tratamento após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE, é possível afirmar que existe um aumento da vacuolização citoplasmática e nuclear. Apesar do aumento do tempo de

incubação, as células HepG2 tratadas com hAMPE continuam a apresentar uma elevada vacuolização tal como um elevado número de *blebs*.



**Figura 3.19 - Avaliação morfológica da morte celular, através da técnica de esfregaços, na linha celular Hep3B2.1-7.** Imagens ilustrativas da condição controlo, incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 24 e incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Experiência repetida três vezes, utilizando para tal três membranas amnióticas diferentes. As imagens foram tiradas aleatoriamente por toda a lâmina, sendo escolhidas imagens representativas da situação geral observada em cada condição.

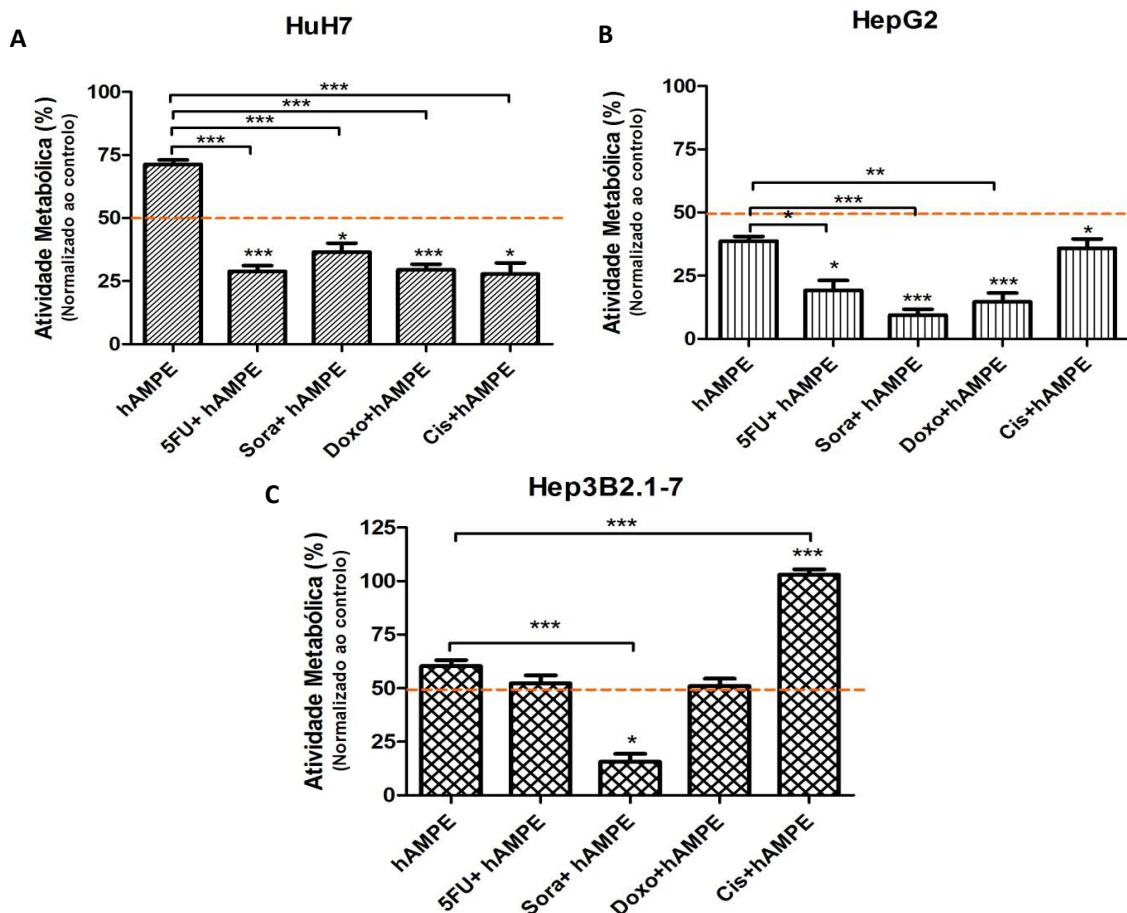
Na figura relativa à condição controlo da linha celular Hep3B2.1-7 (figura 3.19) verifica-se um baixo número de agregados celulares e a presença de células com uma elevada heterogeneidade de tamanho. As células revelam elevada viabilidade.

As imagens relativas ao primeiro tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 24 horas, revelam uma elevada vacuolização citoplasmática e alguma vacuolização nuclear. Para além dos vacúolos, é também possível observar uma elevada formação de *blebs*.

No que diz respeito à incubação durante 72 horas, verifica-se também uma elevada vacuolização citoplasmática e um elevado número de *blebs*. É possível verificar a existência de alguma necrose evidenciada pela existência de rebentamento citoplasmático.

### **3.10 - Terapia combinada**

O perfil de quimiorresistência à terapia citostática e/ou citotóxica do CHC confere-lhe um mau prognóstico e uma elevada taxa de mortalidade. Com o objetivo de avaliar os efeitos da combinação de agentes terapêuticos, como o 5-FU, o Sora, a Doxo e a Cis, com hAMPE recorreu-se ao ensaio de MTT. Os gráficos da figura 3.20 expressam a atividade metabólica obtida após terapia combinada nas linhas celulares HuH7 (fig.3.20 A), HepG2 (fig3.20. B) e Hep3B2.1-7 (fig.20 C) após 72 horas de incubação.



**Figura 3.20 - Avaliação da atividade metabólica após tratamento com terapia combinada nas linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C), através do ensaio de MTT. (A)** A linha celular HuH7 foi incubada com 0,5µg/µL de hAMPE em combinação com 88,3µM de 5-fluorouracilo, 5,2µM de sorafenib, 0,4µM de doxorubicina e 2,9µM de cisplatina; (B) A linha celular HepG2 foi incubada com 0,5µg/µL de hAMPE em combinação com 18,9µM de 5-fluorouracilo, 4,96µM de sorafenib, 0,29µM de doxorubicina e 2,04µM de cisplatina; (C) A linha celular Hep3B2.1-7 foi incubada com 0,1µg/µL de hAMPE em combinação com 166,62µM de 5-fluorouracilo, 10,62µM de sorafenib, 0,1µM de doxorubicina e 1,51µM de cisplatina. A linha a tracejado representa a percentagem de atividade metabólica induzida pelo IC50 dos fármacos. O gráfico expressa a percentagem de atividade metabólica obtida relativamente ao controlo e os erros padrão de oito experiências independentes obtidas a partir de quatro membranas amnióticas diferentes. As diferenças significativas estão assinaladas com \*, em que \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$ .

Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular HuH7, é possível verificar que relativamente à monoterapia com hAMPE existe uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) para todas as combinações entre fármacos e hAMPE. Esta diferença estatística indica-nos uma diminuição da atividade metabólica de 42% para combinação com 5-fluorouracilo, 34% com sorafenib, 42% com doxorubicina e por último 43% para a combinação com cisplatina.

Comparando os resultados obtidos a partir da combinação relativamente ao IC50 dos fármacos utilizados (redução da atividade metabólica a 50%), verifica-se um decréscimo com significância estatística para todas as combinações. A terapia combinada com 5-FU diminui a atividade metabólica de 50% para 29% após combinação com hAMPE ( $p < 0,001$ ). A combinação com o fármaco sorafenib diminui 13% a atividade metabólica comparativamente à monoterapia ( $p = 0,046$ ). Existe também um decréscimo significativo nas terapias combinadas com doxorubicina ( $p < 0,001$ ) e com cisplatina ( $p = 0,012$ ), uma vez que se verifica uma diminuição significativa de 21% e 22%, respetivamente.

Na linha celular HepG2 verifica-se que a terapia combinada, comparativamente à monoterapia com hAMPE, induz um decréscimo significativo da atividade metabólica para todas as condições, à exceção da combinação com cisplatina. A terapia combinada com 5-FU induz uma diminuição significativa de 20% ( $p = 0,01$ ) da atividade metabólica. A incubação de hAMPE e sorafenib produz uma diminuição de cerca de 30% ( $p < 0,001$ ) e, por último, a combinação com doxorubicina induz uma diminuição estatisticamente significativa ( $p = 0,001$ ) de 24%.

Relacionando os resultados obtidos a partir da terapia combinada com o IC50 de cada um dos fármacos, observa-se que existe um decréscimo com significado estatístico para todas as condições. Relativamente ao IC50, a terapia combinada com 5-FU diminui a atividade metabólica em 31% ( $p = 0,01$ ). A combinação com sorafenib, bem como com a doxorubicina, induz um decréscimo com significância estatística ( $p < 0,001$ ) de 41% e 35%, respetivamente.

Relativamente à terapia combinada com cisplatina, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,047$ ) de 14% relativamente ao IC50 do fármaco.

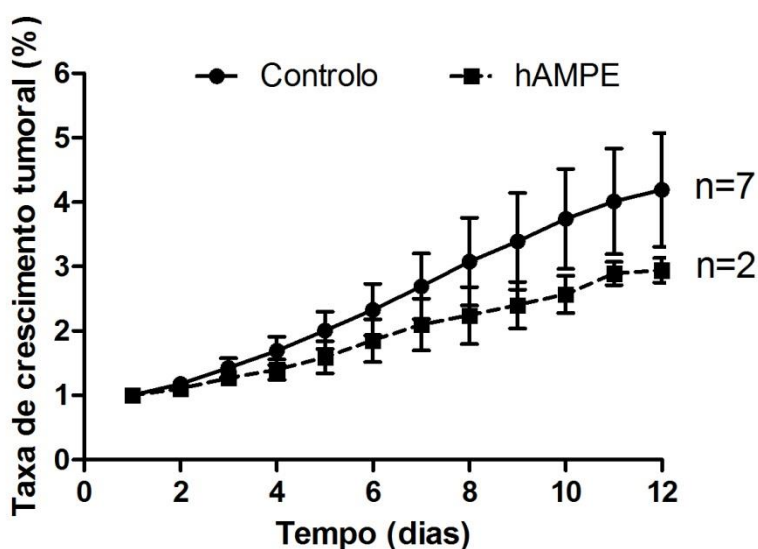
Observando os resultados expressos no gráfico (C), relativos à linha celular Hep3B2.1-7, e comparando a atividade metabólica da terapia combinada com a monoterapia com hAMPE, verifica-se que existe um decréscimo significativo ( $p<0,001$ ) de 44% após terapia combinada com sorafenib. Contrariamente a todos os outros resultados, existe também um aumento com elevada significância estatística ( $p<0,001$ ) de 43% após combinação com a cisplatina. Relativamente à incubação com os outros fármacos, não existem alterações significativas relativamente à monoterapia com hAMPE.

De forma semelhante à comparação da terapia combinada com hAMPE, também na comparação entre a terapia combinada com o IC50 de cada um dos fármacos se verifica uma diminuição com significância estatística ( $p<0,001$ ) na combinação entre hAMPE e sorafenib. Observa-se um aumento da atividade metabólica na terapia combinada com cisplatina, resultando numa diferença de 53% ( $p<0,001$ ).

### **3.11 - Estudos *in vivo***

Os estudos *in vivo* permitem uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no crescimento tumoral. Assim, de modo a avaliar o efeito do hAMPE no crescimento de tumores de CHC *in vivo*, ratinhos *Balb/c nu/nu* foram divididos em dois grupos diferentes, o grupo 1 ou grupo controlo, apenas injetado heterotopicamente no dorso com células da linha celular HuH7, e o grupo

2, o grupo de ratinhos sujeitos a terapia com hAMPE após inoculação celular. Os resultados obtidos relativos à taxa de crescimento tumoral para os dois grupos encontram-se expressos na figura 3.21.

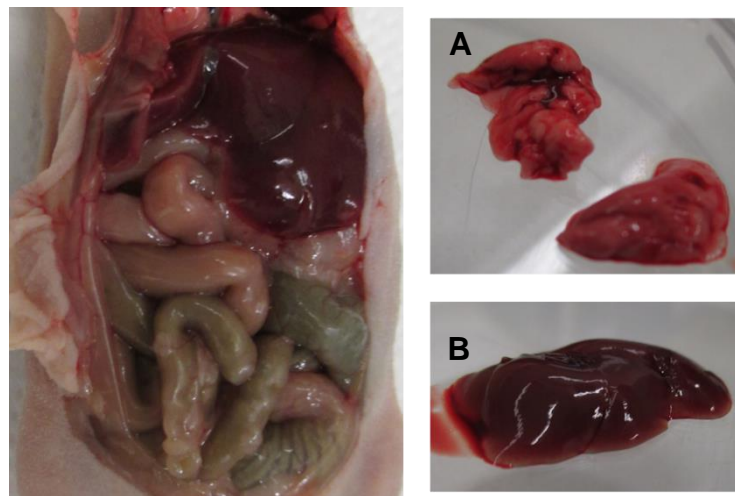


**Figura 3.21 - Evolução do crescimento tumoral ao longo de doze dias de terapia com hAMPE.** Ao longo de doze dias, os ratinhos Balb/c nu/nu xenotransplantados com a linha celular HuH7 foram submetidos a uma terapia intraperitoneal com hAMPE. Como controlo, foram considerados ratinhos que não foram submetidos a tratamento com hAMPE. Os resultados expressam a média de sete ratinhos controlo e de dois ratinhos submetidos a terapia e o respetivo erro padrão.

Como demonstrado na figura 3.21, após sete dias de terapia intraperitoneal com hAMPE verifica-se que existe diferença na taxa de crescimento tumoral entre os animais do grupo de controlo, não submetidos a tratamento, e os animais do grupo 2, submetidos a tratamento com hAMPE. Desta forma, é possível verificar que, ao longo dos doze dias, o crescimento tumoral dos animais submetidos à terapia tende a ser diferente, sendo maior no grupo controlo relativamente ao grupo sujeito a terapia. Ao fim de doze dias, a taxa de crescimento tumoral do

grupo controlo é duas vezes superior à do grupo sujeito a terapia não tendo sido realizado tratamento estatístico por serem resultados preliminares

Vale a pena referir que não foram registadas alterações da massa dos animais ao longo do tempo. Também não foram registadas alterações comportamentais ou qualquer outra reação adversa à terapia. Após ocisão, o hábito interno e externo foi analisado e não se registaram alterações macroscópicas, como mostrado na figura 3.22.



**Figura 3.22 - Hábito interno de um ratinho sujeito a terapia intraperitoneal com hAMPE, com particular ênfase nos pulmões (A) e fígado (B).**



# *Capítulo 4*

**DISCUSSÃO**



O carcinoma hepatocelular representa atualmente um importante problema de saúde pública. Para além do aumento da sua incidência, este tipo de tumor não possui muitas opções terapêuticas, fatores que largamente determinam a sua elevada taxa de mortalidade<sup>4</sup>. Quando a deteção do carcinoma hepatocelular é realizada num estadio inicial, o transplante hepático ortotópico e a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial são os tratamentos mais utilizados<sup>31,32</sup>. Contudo, o carcinoma hepatocelular é, por norma, detetado em estadios avançados da doença, inviabilizando a utilização das técnicas curativas já mencionadas<sup>11</sup>. Neste caso, a radioterapia e a quimioterapia são as terapêuticas consideradas, apesar de ambas não serem particularmente eficazes devido ao perfil radorresistente e quimiorresistente do carcinoma hepatocelular<sup>40,41</sup>.

Considerando a elevada necessidade de tratamentos eficazes para o carcinoma hepatocelular, particularmente em estadios avançados da doença, é urgente desenvolver novas abordagens terapêuticas para este tipo de cancro.

Ao longo dos últimos anos, a investigação sobre as diversas propriedades terapêuticas da hAM tem vindo a aumentar<sup>75,89,151</sup>. Muitos foram os trabalhos científicos publicados sobre as suas características peculiares, artigos que tornaram óbvio para a comunidade médica e científica que este tecido poderia ser útil na terapia de diversas patologias<sup>91,109,115,152,153</sup>. Concretamente na Oncologia, a ideia de utilizar a membrana amniótica como potencial terapia surgiu em 2008 através de Seo *et al*<sup>88</sup>. Desde então vários artigos foram publicados, revelando o efeito anti-cancerígeno de vários derivados da hAM, como as suas células ou o seu meio condicionado<sup>105,108,110,154,155</sup>. De forma inovadora, a equipa de investigação da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade

de Coimbra decidiu avaliar o efeito do hAMPE na atividade metabólica de diversas linhas celulares humanas, tendo descoberto um elevado potencial anticancerígeno do hAMPE no carcinoma hepatocelular<sup>118</sup>.

Assim, este trabalho experimental teve como principal objetivo avaliar o efeito anticancerígeno do hAMPE em três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular, contribuindo assim para o estudo dos mecanismos de ação responsáveis pelo seu efeito.

A preparação do hAMPE foi realizada de acordo com o trabalho de Mamede *et al*, recorrendo apenas a meios de extração mecânicos, como a homogeneização, a sonicação e a centrifugação<sup>118</sup>. Na preparação do hAMPE não foram considerados outros meios de extração para além dos mecânicos para impedir a introdução de químicos ou de enzimas no extrato que poderiam condicionar os resultados obtidos posteriormente *in vitro* e *in vivo*. A hAM cortada em pequenos pedaços foi inicialmente colocada em PBS estéril, uma solução salina isotónica tamponada que permite a estabilização do pH das diversas proteínas, mantendo assim a sua estrutura nativa e evitando a sua desnaturação<sup>156</sup>. Por outro lado, o PBS é um bom solvente para as proteínas pois não possui componentes com absorvância a 280nm, não interferindo assim com o ensaio de quantificação proteico realizado após extração. Após a adição do PBS aos pequenos pedaços de hAM, esta foi sujeita a homogeneização em *potter*, devidamente esterilizado, com o objetivo de romper a membrana celular e de homogeneizar o tecido através da pressão e da fricção gerada<sup>157,158</sup>. Posteriormente, a sonicação em banho de ultrassons permitiu a lise das membranas celulares levando à libertação das proteínas<sup>159</sup>. Foi utilizado um

sistema de sonicação indireto para evitar o contacto da sonda com a amostra e para evitar a possibilidade de contaminação da mesma, sendo por isso este um método de eleição para amostras estéreis. O método de sonicação indireto é mais efetivo para amostras pequenas pois evita a formação de espuma e a consequente perda de amostra<sup>160</sup>. Após a homogeneização e a sonicação, recorreu-se à centrifugação diferencial com o objetivo de obter a fração celular apropriada, neste caso, a fração superior solúvel. Para tal, foi utilizado um programa de centrifugação a 14000G, durante 15 min, à temperatura de 4°C que nos permitiu isolar as proteínas na fração superior solúvel, dos restantes componentes e detritos celulares que se encontravam no *pellet*<sup>161</sup>. Uma vez que tanto a homogeneização como a sonicação podem induzir aquecimento da amostra, todo o processo foi realizado em gelo para prevenir a desnaturação e a destabilização proteica, bem como para diminuir a atividade das proteases<sup>156</sup>.

Após a extração mecânica, as proteínas isoladas foram posteriormente filtradas para garantir a sua esterilidade, condição necessária para a condução dos estudos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, a amostra foi quantificada recorrendo ao NanoDrop®, tendo como base o princípio da absorvância das proteínas a 280nm<sup>162</sup>. De referir ainda que as amostras obtidas foram divididas em alíquotas para evitar ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos que levariam à sua degradação<sup>156</sup>.

Para caracterizar o hAMPE, foi utilizada a técnica de eletroforese 2D. Este tipo de eletroforese permite uma separação proteica com elevada eficiência tendo em conta que a esta separação se baseia em dois parâmetros distintos, o ponto isoelétrico e o peso molecular de cada proteína<sup>119,163</sup>.

Com o objetivo de precipitar o hAMPE foi adicionada acetona gelada ao extrato. Sabe-se que a preparação de amostras é crucial para a obtenção de bons resultados através da eletroforese 2D e por isso foi utilizada a acetona, um dos agentes precipitantes mais utilizados por promover uma eficiente concentração da amostra e eliminação de contaminantes<sup>164</sup>. Para a solubilização da amostra foi adicionado tampão de rehidratação, um tampão comercial cuja formulação é compatível com todo o procedimento de eletroforese 2D<sup>122,165</sup>. Para além da solubilização proteica, este tampão assegura a desnaturação das proteínas. Para tal, este tampão contém na sua formulação agentes desnaturantes como a ureia e a tiourea, agentes solubilizadores como detergentes e anfólitos e agentes redutores como o DTT<sup>122</sup>.

Com o objetivo de avaliar a eficiência do método de precipitação utilizado, quantificando assim as proteínas presentes no extrato final obtido após precipitação com a acetona e a solubilização em tampão de rehidratação, utilizou-se um *kit* comercial de quantificação proteica, o *2D-Quant kit*. Apesar da execução da quantificação proteica através deste *kit* ser morosa e mais complexa do que outros métodos de quantificação proteica mais vulgares, a sua utilização foi necessária pois este *kit* é compatível com as concentrações de ureia e de tiourea presentes nas amostras devido à solubilização destas no tampão de rehidratação referido.

Após a quantificação proteica, todo o protocolo de eletroforese 2D e de coloração dos géis foi realizado de acordo com as indicações do fornecedor (Biorad<sup>®</sup>)<sup>122</sup>. Obteve-se, no final da técnica, um gel com um grande conteúdo de

proteínas, homogeneamente distribuídas e com diferentes intensidades, sinal indicativo da presença de proteínas em diferentes concentrações.

No futuro, pretende-se excisar individualmente cada proteína do gel e identificar individualmente cada uma através da tecnologia de MALDI-TOF (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*). Pretende-se também, através desta técnica, comparar as proteínas isoladas a partir de várias hAM. Tendo em conta a grande homogeneidade de resultados obtidos entre as diferentes hAM, pretendemos focar a nossa atenção no estudo do grupo de proteínas que por norma se mantém constante entre as amostras das várias dadoras.

Por ser um trabalho pioneiro, não existem publicações sobre o efeito do hAMPE em linhas celulares cancerígenas. Por este motivo, recorreremos a várias técnicas de biologia celular e molecular para estudar os efeitos celulares do hAMPE e, assim, conseguir documentar e melhor os caracterizar.

Para avaliar os efeitos do hAMPE na atividade metabólica, no conteúdo proteico total e no conteúdo de ADN total nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular recorreu-se aos ensaios de MTT, de SRB e de Violeta de Cristal, respetivamente. Através destes ensaios pode verificar-se que a atividade metabólica, o conteúdo proteico total e o conteúdo de ADN total são afetados pelo tratamento com hAMPE. No entanto, verifica-se também que a dose e o tempo de incubação determinaram os resultados obtidos nos vários ensaios.

Tendo em conta os resultados obtidos através do ensaio de MTT, podemos afirmar que o tratamento com hAMPE interfere com a atividade metabólica celular. Tal pode ser um indicador que as células, após tratamento com hAMPE, possuem

um metabolismo celular reduzido devido à interferência do tratamento com o fluxo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)<sup>166,167</sup>. Uma vez que o NADPH reage com o MTT formando formazano, pode concluir-se que, quanto menor a atividade metabólica celular, menor a concentração de NADPH celular<sup>167</sup>. Uma vez que o NADPH está envolvido na formação de lípidos e de ácidos gordos e é responsável por combater efeitos nocivos na célula induzidos por radicais de oxigênio, algumas vias metabólicas e os níveis de stresse oxidativo poderão estar comprometidos.

Através do ensaio de SRB, verifica-se que o hAMPE é eficiente na diminuição do conteúdo proteico total em todas as linhas celulares em estudo. Esta diminuição poderá ser consequência da atuação do hAMPE a nível do ADN que, conseqüentemente, induzirá alterações nos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm), essencial para o processo de síntese proteica<sup>127</sup>. Uma vez que verificámos, através do ensaio cometa, que apenas a linha celular HepG2 sofria danos no seu ADN, poderá ser possível que nas linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 tenha sido induzido outro tipo de dano celular, na complexa cadeia entre o ADN e a síntese final de proteínas, que possa também traduzir-se na redução da síntese proteica total.

Verificou-se uma diminuição do conteúdo total de ADN nas três linhas de carcinoma hepatocelular estudadas através do ensaio do violeta de cristal. É possível assim afirmar que o hAMPE interfere com a síntese de ADN. Tal como referido anteriormente, verificou-se que o hAMPE induz danos no ADN na linha celular HepG2, ao contrário do que acontece com as outras duas linhas celulares. Contudo, a diminuição da síntese de ADN pode não estar intrinsecamente



correlacionada com danos ligados ao ADN como acontece nas linhas Hep3B2.1-7 e HuH7. Os resultados observados nestas linhas podem estar ligados a mecanismos de inibição da síntese de ADN através da interferência direta com as moléculas necessárias para a polimerização e/ou replicação de ADN como também com inibição de fatores essenciais à regulação do ciclo celular e dos seus pontos de controlo<sup>168</sup>. A inibição de, por exemplo, topoisomerases (essenciais à replicação de ADN) ou de ADN polimerase (essencial à polimerização de ADN) podem estar ligadas à redução da síntese de ADN. Do mesmo modo, também a inibição das Cdk pode estar envolvida com a diminuição da replicação através da regulação do ciclo celular<sup>168</sup>.

No desenvolvimento de uma terapêutica anti-cancerígena, torna-se importante garantir que as células não tumorais não são afetadas pela mesma. Por este motivo, avaliámos o efeito do hAMPE na atividade metabólica, no conteúdo proteico total e no conteúdo de ADN total da linha celular HFF1, considerando apenas a concentração superior do hAMPE (1µg/µL) e o maior tempo de incubação (72 horas). Esta concentração e tempo de incubação foram escolhidos pois esta condição induz a maior inibição dos vários parâmetros avaliados em todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Após observação dos resultados obtidos, verificou-se que a atividade metabólica, o conteúdo proteico total e o conteúdo de ADN total da linha celular não cancerígena não são inibidos após exposição ao hAMPE. Na verdade, pode verificar-se que a atividade metabólica não se altera mas que o conteúdo proteico total e o conteúdo de ADN total aumentam. Desta forma, podemos afirmar que o hAMPE não possui efeitos citotóxicos ou citostáticos na linha celular não

cancerígena HFF1. Considerando outros derivados da hAM, como as hAECs, hAMCs ou meio condicionado, vários artigos corroboram estes resultados, tendo os autores verificado apenas uma diminuição da proliferação das células cancerígenas após tratamento com os derivados da hAM, contrariamente à proliferação continuada nas linhas celulares não tumorais<sup>105,111,112</sup>. Tendo em conta os resultados obtidos na linha celular não tumoral HFF1, pretende-se futuramente realizar os mesmos estudos numa linha celular de hepatócitos, representando esta linha celular o controlo ideal para o nosso estudo, por ter origem similar às linhas celulares cancerígenas avaliadas.

Após a verificação da inibição da atividade metabólica, do conteúdo proteico total e do conteúdo de ADN total nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular, e de nos assegurarmos que o hAMPE não induz efeitos inibitórios numa linha celular não cancerígena, recorreremos a diferentes técnicas de biologia celular e molecular para avaliar as alterações no ciclo celular utilizando a citometria de fluxo, os danos no ADN recorrendo ao ensaio cometa, os tipos de morte celular induzidos utilizando a técnica dos esfregaços e a avaliação de alteração da expressão proteica de P53 e de  $\beta$ -catenina através de *western blot*.

A regulação do ciclo celular é um processo altamente regulado que é essencial para a proliferação celular de qualquer tipo de célula. Durante o ciclo celular existem duas grandes transições entre as diferentes fases que são considerados os *checkpoints* do ciclo celular, nomeadamente a transição da fase G1 para a fase S e a transição da fase G2 para a mitose<sup>138</sup>. De notar ainda que a progressão do ciclo celular, em linhas tumorais, possui um perfil díspar a nível da

regulação, levando à sobreexpressão de reguladores positivos e à inibição de reguladores negativos<sup>169,170</sup>.

Relacionada com a regulação do ciclo celular, encontra-se a expressão da proteína supressora tumoral P53. Esta proteína, para além da regulação do ciclo celular, encontra-se presente em vários mecanismos celulares, como a indução de apoptose, a diferenciação ou a senescência celular<sup>18</sup>. Mutações no gene responsável pela expressão da P53, comumente na origem de vários tipos de tumores, podem resultar na expressão de uma P53 mutada ou de uma P53 inativa e podem até existir células tumorais sem expressão de P53<sup>18</sup>. Estas alterações na expressão da P53 levam à regulação aberrante de vários mecanismos relacionados, por exemplo, com a morte celular, como ciclo celular e com os danos no DNA<sup>18,20,22</sup>.

A via Wnt/ $\beta$ -catenina foi considerada inicialmente como uma via de sinalização com possível ação tumorigénica no cancro colorretal<sup>23,171</sup>. No entanto, já foi provado, em vários tipos de cancro como o carcinoma hepatocelular, que mutações oncogénicas na regulação da  $\beta$ -catenina levam a um aumento da sobrevivência a partir desta via de sinalização<sup>27,140,172</sup>.

Avaliando os resultados obtidos para a linha celular HuH7 relativos ao ciclo celular, podemos observar que existe uma diminuição da população celular em G0/G1 e um aumento em G2/M. Na linha Hep3B2.1-7, tal como na linha HuH7, podemos observar uma diminuição na fase G0/G1 e um aumento da população na fase S. Através da análise da expressão da P53, verificou-se que na linha celular HuH7 existe uma diminuição da expressão desta proteína após tratamento com hAMPE, tendo em conta que esta linha sobreexpressa uma forma da P53 mutada.

De notar ainda que a P53 mutada é um fator de sobrevivência celular e que a sua diminuição leva a uma diminuição da sobrevivência celular<sup>173</sup>. A linha celular Hep3B2.1-7 não expressa esta proteína. Tendo em conta que a P53 é um dos principais reguladores do ciclo celular, o facto das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 não possuírem uma normal expressão de P53 pode levar a que a regulação do ciclo celular nestas linhas celulares seja efetuada por vias alternativas à P53. Tendo em conta que a expressão de P53 se encontra alterada, poderá não existir uma expressão de P21 normal. A expressão de P21 é um dos principais mecanismos de bloqueio da transição da fase G1 para a fase S. Desta forma, quando existe um dano celular, a P21 leva à paragem do ciclo celular em G0/G1 até que a célula repare o dano, prosseguindo posteriormente o ciclo celular ou promovendo a morte celular<sup>174</sup>. Assim, através dos resultados obtidos poderemos sugerir que as alterações da expressão da P53 ou a não existência da P53, poderão alterar a expressão de P21, permitindo a estas duas linhas celulares uma progressão no ciclo celular sem que haja bloqueio em G0/G1 apesar da existência de danos celulares.

Outro resultado relevante está relacionado com a alteração da expressão de  $\beta$ -catenina, onde se verificou uma diminuição da expressão desta proteína na linha celular HuH7 e também na linha celular Hep3B2.1-7 após tratamento com hAMPE. Mutações no complexo APC ou mutações na própria  $\beta$ -catenina são fatores que podem induzir à estabilização e à acumulação da  $\beta$ -catenina no citoplasma e, conseqüentemente, à sua translocação para o núcleo. A translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo leva à transcrição de genes alvo como o c-myc e VEGF. Um estudo de Wu *et al.* revela que a inibição da produção de  $\beta$ -

catenina estável no citoplasma nas linhas celulares HuH7 e Hep3B2.-7 induz a diminuição da sobrevivência celular<sup>175</sup>. Foi também descrito que a inibição da via Wnt nestas linhas celulares induz um bloqueio do ciclo celular nas fases S e G2/M, corroborando assim os resultados obtidos nestas duas linhas celulares após tratamento com hAMPE. Estes dados indicam-nos que, provavelmente, o hAMPE é capaz de inibir a via Wnt.

Relativamente à linha celular HepG2, foram obtidos resultados com perfil diferente em relação às outras duas linhas celulares estudadas. Esta linha celular possui uma expressão de P53 normal (*wild-type*) e, tal como as outras duas linhas celulares de carcinoma hepatocelular já referenciadas, as vias de sobrevivência encontram-se interligadas com a expressão de  $\beta$ -catenina mutada e com mutações no complexo APC. Na avaliação da expressão da proteína P53 na linha celular HepG2, verifica-se que existe uma diminuição desta proteína após o tratamento com hAMPE. Esta diminuição da expressão de P53 pode estar relacionada com o aumento de cerca de treze vezes do dano de ADN, observado através do ensaio cometa após tratamento com hAMPE. Estes resultados podem ser explicados através da diminuição da expressão de P53, uma vez que esta é uma das principais responsáveis pelos mecanismos de reparação do ADN<sup>22</sup>.

A diminuição da expressão de P53 na linha HepG2, pode levar a uma diminuição da P21, não existindo um ponto de controlo para a transição da fase G0/G1 para S, mesmo existindo danos na célula. Na linha celular HepG2 é possível verificar um bloqueio celular na fase G2/M. Este resultado pode ser explicado pela existência de danos no ADN uma vez que o ponto de controlo G2/M é essencial para manter a estabilidade genómica. O bloqueio nesta fase

impede que as células entrem em mitose quando existem danos no ADN, permitindo à célula ativar os mecanismos de reparação e, desta forma, interromper a proliferação das células danificadas<sup>176</sup>. Um dos principais mecanismos para o bloqueio em G2/M resulta da inibição da cinase dependente de ciclina 2 (Cdk2, do inglês *cyclin-dependent kinase 2*), responsável pela entrada das células em mitose após a fase G2<sup>176</sup>.

Tendo em conta a influência do hAMPE na regulação do ciclo celular e na expressão de P53 nas três linhas celulares estudadas, torna-se pertinente efetuar um estudo da expressão da P21 nas três linhas celulares e verificar qual a influência do tratamento com hAMPE na expressão desta proteína.

O resultado obtido através da técnica nos esfregaços revela-nos que o hAMPE é capaz de induzir morte nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Através da análise das imagens obtidas com a coloração de May-Grünwald-Giemsa, podemos verificar uma elevada vacuolização citoplasmática, um elevado número de projeções do citoplasma, ou *blebs*, mas também a existência de alguma lise citoplasmática. Na literatura, parece não existir um consenso em relação às alterações morfológicas relacionadas com a produção de vacúolos, defendendo alguns autores a vacuolização citoplasmática como indicativo de apoptose e outros como indicativo de necrose<sup>177,178</sup>. Por este motivo, não podemos afirmar com total confiança qual o tipo de morte celular induzido pelo tratamento com hAMPE. Por outro lado, a formação de *blebs* e a lise citoplasmática são claros indicadores de apoptose e de necrose, respectivamente<sup>145</sup>. Tendo em conta que a vacuolização não é uma alteração morfológica consensual entre a apoptose e a necrose, os danos no ADN

observados em HepG2 através do ensaio cometa podem explicar tanto a apoptose como a necrose<sup>178</sup>. Na apoptose celular existe fragmentação nuclear e quebra do ADN em pequenos fragmentos o que, quando correlacionado com a vacuolização citoplasmática, pode ser um indicativo de apoptose. Por outro lado, a eliminação de células com danos no ADN pode também ocorrer por um processo denominado por necrose programada<sup>178</sup>. Este processo ocorre quando existe uma alteração na via apoptótica e se inicia com uma resposta da proteína poli (ADP-ribose) polimerase (PARP, do inglês *poly (ADP-ribose) polymerase*) que, quando ativada, leva a uma rápida diminuição de dinucleótido de nicotinamida e adenina (*NAD*, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) e, conseqüentemente, à inibição da glicólise. Como consequência, existirá uma diminuição de ATP e a indução de morte celular por necrose<sup>178</sup>

Utilizando, futuramente, a técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) poder-se-ão conhecer as alterações metabólicas que poderão existir nestas linhas celulares após tratamento com hAMPE.

A diminuição de  $\beta$ -catenina nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular pode explicar os resultados obtidos após tratamento com hAMPE nos ensaios de MTT, SRB, violeta de cristal e nos esfregaços. Sabe-se que as mutações na regulação da  $\beta$ -catenina são uma das principais vias para a hepatocarcinogénese e que, após tratamento com hAMPE existe uma diminuição de  $\beta$ -catenina. Estudos referem que uma diminuição da  $\beta$ -catenina pode levar à diminuição da sobrevivência celular<sup>173,27,140</sup>. A diminuição desta proteína poderá explicar uma diminuição da atividade metabólica, do conteúdo proteico total e do

conteúdo de ADN total, através da diminuição da sobrevivência celular após incubação com hAMPE, tal como evidenciado nos esfregaços.

Com o objetivo de compreender possíveis vias de atuação do hAMPE na terapia do carcinoma hepatocelular, foram feitas várias combinações entre hAMPE e quatro fármacos, sendo eles o 5-FU, o Sora, a Doxo e a Cis. O 5-FU, a Doxo e a Cis são fármacos comumente utilizados na quimioterapia sistêmica do carcinoma hepatocelular e atuam diretamente ou indiretamente na síntese de ADN diminuindo a sua síntese, induzindo assim um decréscimo da proliferação celular e, conseqüentemente, a morte celular. O Sora está incluído nas terapêuticas dirigidas a alvos moleculares e atua em recetores de tirosina cinases como, por exemplo, o VEGFR ou o PDGFR.

Tendo em conta os resultados obtidos para a linha celular HuH7, observou-se que o hAMPE foi capaz de aumentar a eficácia de todos os fármacos, potenciando o seu efeito. Sendo os tumores que sobreexpressam P53 mais difíceis de tratar, estes resultados revelam que a associação do hAMPE com os vários fármacos pode revolucionar a terapia deste tipo de tumores<sup>179</sup>.

Relativamente à linha celular HepG2, verifica-se que o hAMPE foi também capaz de aumentar a eficácia de todos os fármacos. Uma vez que o tratamento com hAMPE induz um elevado dano no ADN da linha celular HepG2, a associação do hAMPE com o 5-FU, com a Doxo ou com a Cis pode amplificar os danos no ADN, motivo pelo qual se verificou que estas associações induziram uma redução da atividade metabólica relativamente ao IC50 do respetivo fármaco.

Já na linha Hep3B2.1-7, verificou-se que o hAMPE apenas foi capaz de aumentar a eficácia do Sora, antagonizando o efeito da Cis. Tendo em conta os



resultados obtidos para a linha celular Hep3B2.1-7, bem como para todas as outras linhas celulares estudadas, pode concluir-se o hAMPE tem um importante papel quando associado ao Sora. Este efeito notório poder-se-á dever ao facto de um dos mecanismos de atuação do Sora se basear na diminuição da angiogénese, através da inibição do VEGF<sup>50</sup>. Por isso, a associação da capacidade anti-angiogénica do Sora com a da hAM, pode ser o motivo para os bons resultados obtidos em todas as linhas celulares<sup>95,103,104,106,180</sup>. Por outro lado, sabe-se que existe antagonismo entre os inibidores do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) e a Cis<sup>181</sup>. Sabendo que a linha celular Hep3B2.1-7 sobreexpressa EGFR e que as linhas celulares HepG2 e HuH7 não expressam ou expressam residualmente este recetor, pode especular-se se o hAMPE poderá atuar como um inibidor do recetor de EGFR, competindo com a Cis<sup>182,183</sup>. Por outro lado, tendo em conta a potenciação do efeito do Sora na linha celular Hep3B2.1-7, um inibidor dos recetores das tirosina cinases, esta teoria pode ganhar relevância. Para averiguar este possível efeito inibitório de hAMPE nos recetores de tirosina cinase, pretende-se futuramente avaliar a ativação e a inibição de recetores de tirosina cinase após tratamento com hAMPE.

Tendo em conta os promissores resultados obtidos *in vitro*, foram realizados ensaios *in vivo* com o objetivo de compreender se o microambiente tumoral poderia ou não alterar os efeitos anti-cancerígenos do hAMPE. Analisando os resultados obtidos, apesar de preliminares, podemos afirmar que se verificou, tendencialmente, uma diminuição da taxa de crescimento tumoral após tratamento com hAMPE relativamente ao controlo. Esta experiência foi realizada com a linha

celular HuH7 por ser uma linha tumoral com capacidade de crescimento em modelos animais, nomeadamente em ratinhos. Por ser uma terapia inovadora, e por não possuímos qualquer tipo de informação sobre a dose adequada para administração, baseámo-nos na dose de sorafenib administrada (30mg/kg) documentada em vários artigos em estudos *in vivo*<sup>50,184,185</sup>. Como via de administração foi escolhida a via intraperitoneal devido à facilidade com que pode ser executada tendo em conta o reduzido tamanho da estirpe animal utilizada (*Balb/c nu/nu*). Verificou-se que a terapia se revelou um sucesso tendo sido obtidos resultados que revelam que esta, não só é capaz de reduzir a taxa de crescimento tumoral, como os animais submetidos ao tratamento com hAMPE não sofreram qualquer efeito adverso. Torna-se agora importante terminar estes resultados e confirmar se este perfil é também obtido em animais inoculados com as outras duas linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Por outro lado, o modelo heterotópico representou a primeira abordagem para percebermos se o hAMPE tinha efeito *in vivo*. No entanto, conscientes de que o ambiente tumoral deve ser o mais similar possível ao original, torna-se importante realizar no futuro estudos *in vivo* que visem avaliar o efeito anti-cancerígeno do hAMPE em modelos tumorais ortotópicos.

Tendo em conta os resultados obtidos durante todo o trabalho experimental, podemos afirmar que o hAMPE possui um efeito anticancerígeno nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular Hep3B2.1-7, HepG2 e HuH7. Contudo, o seu efeito varia entre as diferentes linhas celulares estudadas. Torna-se agora imperativo esclarecer todos os mecanismos de ação envolvidos neste efeito e comprovar as teorias propostas ao longo deste trabalho para que

possamos contribuir para o esclarecimento do papel da hAM no tratamento oncológico.



# *Capítulo 5*

## **CONCLUSÕES**



Através este trabalho experimental, que teve como principal objetivo avaliar o efeito anticancerígeno do hAMPE em três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular, contribuindo assim para o estudo dos mecanismos de ação responsáveis pelo seu efeito, foi possível retirar as seguintes conclusões:

- A eletroforese 2D revelou que o hAMPE é constituído por uma elevada diversidade de proteínas com diferentes pontos isoelétricos e diferentes pesos moleculares. Esta técnica permitiu-nos ainda concluir que o método de extração das proteínas da hAM mostrou ser eficiente, bem como todo o processo relacionado com a eletroforese 2D.

- Através dos resultados de MTT, SRB e violeta de cristal pode concluir-se que existe uma diminuição da atividade metabólica, do conteúdo proteico total e do conteúdo de ADN total após tratamento com hAMPE em todas as linhas celulares estudadas.

- O tratamento com hAMPE na linha celular não carcinogénica HFF1 não revelou qualquer decréscimo dos parâmetros avaliados pelos ensaios de MTT, SRB e violeta de cristal, o que nos permitiu concluir que este tratamento não é tóxico para a linha celular não cancerígena.

- Através do ensaio cometa verificou-se que o hAMPE é capaz de induzir danos do ADN na linha celular HepG2, ao contrário do que acontece com a linha celular HuH7 e Hep3B2.1-7.

- A avaliação do ciclo celular permitiu concluir que o tratamento com hAMPE induziu alterações na regulação do ciclo celular, levando a um bloqueio celular na

fase S na linha celular Hep3B2.1.-7 e na fase G2/M nas linhas celulares HuH7 e HepG2.

- Através da análise da expressão da  $\beta$ -catenina, verificou-se que existe uma diminuição da expressão desta proteína nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas. O tratamento com hAMPE também induziu uma diminuição da P53 nas linhas celulares HuH7 e HepG2.

- Os resultados obtidos através da técnica dos esfregaços revelaram que o tratamento com hAMPE induziu morte celular nas três linhas celulares em estudo.

- A terapia combinada revelou resultados promissores, particularmente nas linhas celulares HuH7 e HepG2, onde o hAMPE foi capaz de potenciar a ação de todos os fármacos.

- Os estudos *in vivo*, apesar de preliminares, parecem indicar que o hAMPE foi capaz de reduzir a taxa de crescimento tumoral.



# *BIBLIOGRAFIA*



1. Ahmed, I. & Lobo, D. N. Malignant tumours of the liver. *Surg.* **27**, 30–37 (2009).
2. Goodman, Z. D. Neoplasms of the liver. *Mod. Pathol.* **20 Suppl 1**, S49–60 (2007).
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. (2013).
4. Yang, J. D. & Roberts, L. R. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 448–58 (2010).
5. Wands, J. Hepatocellular Carcinoma and Sex. *N. Engl. J. Med.* 1974–1976 (2007).
6. Naugler, W. E. *et al.* Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* **317**, 121–4 (2007).
7. Brechot, C. *et al.* Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol. Biol. (Paris)*. **58**, 278–87 (2010).
8. Neuveut, C., Wei, Y. & Buendia, M. A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **52**, 594–604 (2010).
9. Levrero, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* **25**, 3834–47 (2006).
10. Blonski, W. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3603 (2010).
11. El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557–76 (2007).
12. Chuang, S.-C., La Vecchia, C. & Boffetta, P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Lett.* **286**, 9–14 (2009).
13. Malhi, H., Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Hepatocyte Death : A Clear and Present Danger. 1165–1194 (2010). doi:10.1152/physrev.00061.2009.
14. Thorgeirsson, S. S. & Grisham, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* **31**, 339–46 (2002).
15. Alves, R. *et al.* Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Ann. Hepatol.* **10**, 21–7 (2011).

16. Torbenson, MD, M. *et al.* Concurrent Evaluation of p53, b-catenin, and  $\alpha$ -Fetoprotein Expression in Human Hepatocellular Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 377–382 (2004).
17. Inagawa, S., Itabashi, M. & Adachi, S. Expression and Prognostic Roles of  $\beta$  - Catenin in Hepatocellular Carcinoma : Correlation with Tumor Progression and Postoperative Survival. *Clin Cancer Res* **8**, 450–456 (2002).
18. Bai, L. & Zhu, W. p53 : Structure , Function and Therapeutic Applications. *J. Cancer Mol.* **2**, 141–53 (2006).
19. Chen, G. G. *et al.* Mutation of p53 in recurrent hepatocellular carcinoma and its association with the expression of ZBP-89. *Am. J. Pathol.* **162**, 1823–9 (2003).
20. Muller, P. a J. & Vousden, K. H. P53 Mutations in Cancer. *Nat. Cell Biol.* **15**, 2–8 (2013).
21. Bressac, B. *et al.* Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1973–7 (1990).
22. Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W. & Harris, C. C. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* **26**, 2166–76 (2007).
23. Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–36 (2012).
24. Buendia, M. a. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 185–200 (2000).
25. Ji, J., Yamashita, T. & Wang, X. W. Wnt/beta-catenin signaling activates microRNA-181 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci.* **1**, 4 (2011).
26. Merle, P. *et al.* Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, 1110–1122 (2004).
27. Inagawa, S., Itabashi, M. & Adachi, S. Expression and Prognostic Roles of  $\beta$  - Catenin in Hepatocellular Carcinoma : Correlation with Tumor Progression and Postoperative Survival Expression and Prognostic Roles of  $\beta$  -Catenin in Hepatocellular Carcinoma : Correlation with Tumor Progression and Po. 450–456 (2002).
28. Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V & Kaykas, A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 691–701 (2004).

29. Alberts, B. *et al. Biologia molecular da célula*. 1396 (2009).
30. Bruix, J. & Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **42**, 1208–36 (2005).
31. Wörns, M. a & Galle, P. R. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Dig. Liver Dis.* **42**, 302–9 (2010).
32. Bruix, J. & Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* **53**, 1020–2 (2011).
33. Wrzesinski, S. H., Taddei, T. H. & Mario Strazzabosco. Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis* **15**, 423–41 (2013).
34. Wörns, M. A., Weinmann, A., Schuchmann, M. & Galle, P. R. Systemic therapies in hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis.* **27**, 175–88 (2009).
35. Bruix, J., Boix, L., Sala, M. & Llovet, J. M. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **5**, 215–9 (2004).
36. Forner, A., Hessheimer, A. J., Isabel Real, M. & Bruix, J. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **60**, 89–98 (2006).
37. Ma S, Jiao B, Liu X, Yi H, Kong D, Gao L, Zhao G, Yang Y, L. X. Approach to radiation therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* **36**, 157–63 (2010).
38. Feng, M. & Ben-Josef, E. Radiation therapy for hepatocellular carcinoma. *Semin. Radiat. Oncol.* **21**, 271–7 (2011).
39. Yeo, W. *et al.* A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1532–8 (2005).
40. Johnson, P. J. Systemic chemotherapy of liver tumors. *Semin. Surg. Oncol.* **19**, 116–24 (2000).
41. Giglia JL, Antonia SJ, Berk LB, Bruno S, Dessureault S, F. S. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future. *Cancer Control.* **17**, 120–9 (2010).
42. A, V. & JM, L. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **140**, 1410–26 (2011).

43. Gewirtz, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 727–41 (1999).
44. Lee, T., Lau, T. & Ng, I. Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, 78–86 (2002).
45. Thorn, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* **21**, 440–446 (2012).
46. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–8 (2003).
47. Parker, W. B. & Cheng, Y. C. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol. Ther.* **48**, 381–95 (1990).
48. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–79 (2003).
49. Florea, A.-M. & Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. **3**, 1351–71 (2011).
50. Liu, L. *et al.* Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* **66**, 11851–8 (2006).
51. Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. & King, R. G. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* **114**, 397–407 (2004).
52. Carlson, B. M. in *Hum. Embryol. Dev. Biol.* 131–152 (Elsevier).
53. Kang, N-H, Hwang, K-a, Kim, S U, Kim, Y-B, Hyun, S-H, Jeung, E-B, Choi, K.-C. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Ther.* **19**, 517–22 (2012).
54. Kesting, M. R., Wolff, K.-D., Nobis, C. P. & Rohleder, N. H. Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac. Surg.* (2012). doi:10.1007/s10006-012-0382-1
55. Evangelista, M., Soncini, M. & Parolini, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* **58**, 33–42 (2008).

56. Niknejad, Hassan, Peirovi, Habibollah, Jorjani, Masoumeh, Ahmadiani, Abolhassan, Ghanavi, Jalal, Seifalian, A. M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* **15**, 88–99 (2008).
57. Coradini, D., Casarsa, C. & Oriana, S. Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* **32**, 552–64 (2011).
58. Turley, E. a, Veiseh, M., Radisky, D. C. & Bissell, M. J. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **5**, 280–90 (2008).
59. Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B. & Strom, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* **23**, 1549–59 (2005).
60. Toda, Ayaka, Okabe, Motonori, Yoshida, Toshiko, Nikaido, T. The Potential of Amniotic Membrane / Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J Pharmacol Sci.* **228**, 215–228 (2007).
61. Pollard, S. M., And, N. N. A. & Symonds, E. M. Scanning Electron Microscope Appearances of Normal Human Amnion and Umbilical Cord at Term. *Int. J. Obstet. Gynecol.* **83**, 470–477 (1976).
62. Ken-ichi Endo, Takahiro Nakamura, Satoshi Kawasaki, S. K. Human Amniotic Membrane, Like Corneal Epithelial Basement Membrane, Manifests the 5 Chain of Type IV Collagen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1771–1774 (2004).
63. Malak, T. M. *et al.* Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* **14**, 385–406 (1993).
64. Prvost, T. P. & Socrate, S. Biomechanics of the Human Chorioamnion. (2006).
65. Niknejad, H., Deihim, T., Solati-Hashjin, M. & Peirovi, H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology* **63**, 145–51 (2011).
66. Bryant-Greenwood. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* (1998).
67. Potts, J. R. & Campbell, I. D. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol.* **15**, 313–20; discussion 321 (1996).
68. Hynes, R. O. & Yamada, K. M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.* **95**, 369–77 (1982).

69. Colognato, H. & Yurchenco, P. D. Form and Function : The Laminin Family of Heterotrimers. *Dev Dyn.* **234**, 213–234 (2000).
70. Soncini M1, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, P. O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 296–305 (2007). doi:10.1002/term
71. M, Meinert, Eriksen GV, Petersen AC, Helmig RB, Laurent C, Uldbjerg N, M. A. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **184**, 679–85 (2001).
72. Iozzo, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 646–56 (2005).
73. Yanagishita, M. [Function of proteoglycans in the extracellular matrix]. *Kokubyo Gakkai Zasshi.* **64**, 193–204 (1997).
74. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, K. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338–45 (2004).
75. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, B. M. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res.* **349**, 447–58 (2012).
76. Wolbank, S. *et al.* Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng.* **13**, 1173–83 (2007).
77. Benirschke, K. Remarkable placenta. *Clin. Anat.* **11**, 194–205 (1998).
78. Beall, M. H., van den Wijngaard, J. P. H. M., van Gemert, M. J. C. & Ross, M. G. Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta* **28**, 824–32 (2007).
79. Wolf, H. J. & Desoye, G. Immunohistochemical localization of glucose transporters and insulin receptors in human fetal membranes at term. *Histochemistry* **100**, 379–85 (1993).
80. Olson, D. M. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **17**, 717–730 (2003).
81. Yoshimura S, Nishimura T, Y. Y. The morphometry of the Sudan-III-positive granules in the cytoplasm of the human amniotic epithelium. *Acta Cytol.* **24**, 44–8 (1980).



82. Prostaglandins, M. B. Med. Volume 64. **64**, 10–12 (1971).
83. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, M. M. Cytokines , Prostaglandins and Parturition — A Review. *Placenta* **17**, 2–6 (2003).
84. Tuckey, R. C. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* **26**, 273–81 (2005).
85. Jones, H. N., Powell, T. L. & Jansson, T. Regulation of placental nutrient transport--a review. *Placenta* **28**, 763–74 (2007).
86. Benedetto MT, De Cicco F, Rossiello F, Nicosia AL, Lupi G, D. S. Oxytocin receptor in human fetal membranes at term and during labor. *J Steroid Biochem* **35**, (1990).
87. Dutta-Roy, a K. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 315S–22S (2000).
88. Seo, J. H., Kim, Y. H. & Kim, J. S. Properties of the amniotic membrane may be applicable in cancer therapy. *Med. Hypotheses* **70**, 812–4 (2008).
89. Miki, T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res. Ther.* **2**, 25 (2011).
90. Parolini, O. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 300–11 (2008).
91. Manuelpillai, U., Moodley, Y., Borlongan, C. V & Parolini, O. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta* **32 Suppl 4**, S320–5 (2011).
92. Adinolfi M, Akle CA, McColl I, Fensom AH, Tansley L, Connolly P, Hsi BL, Faulk WP, Travers P, B. W. Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 325–7 (1982).
93. Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R. & Usui, M. Immunogenicity of Human Amniotic Membrane in. 1539–1546 (2001).
94. Wang, M. *et al.* Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 1522–32 (2006).
95. Shimmura, S., Shimazaki, J., Ohashi, Y. & Tsubota, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* **20**, 408–13 (2001).

96. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, T. K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* **24**, 206–212 (2005).
97. He H, Li W, Tseng DY, Zhang S, Chen SY, Day AJ, T. S. Biochemical characterization and function of complexes formed by hyaluronan and the heavy chains of inter-alpha-inhibitor (HC\*HA) purified from extracts of human amniotic membrane. *J. Biol. Chem.* **284**, 20136–46 (2009).
98. Ueta M, Kweon MN, Sano Y, Sotozono C, Yamada J, Koizumi N, Kiyono H, K. S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 464–70 (2002).
99. Hao, Y., Ma, D. H., Hwang, D. G., Kim, W. S. & Zhang, F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* **19**, 348–52 (2000).
100. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, A. H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 900–7 (2005).
101. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, T. S. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 444–9 (2001).
102. Zhang Q, Shimoya K, Moriyama A, Yamanaka K, Nakajima A, Nobunaga T, Koyama M, Azuma C, M. Y. Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 573–9 (2001).
103. Shao, C. Suppression of Corneal Neovascularization by PEDF Release from Human Amniotic Membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1758–1762 (2004).
104. Niknejad, H., Paeini-Vayghan, G., Tehrani, F. a, Khayat-Khoei, M. & Peirovi, H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta* **34**, 340–5 (2013).
105. Niknejad, H., Khayat-Khoei, M., Peirovi, H. & Abolghasemi, H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy* **16**, 33–40 (2014).
106. Jiang, A. *et al.* In vivo and in vitro inhibitory effect of amniotic extraction on neovascularization. *Cornea* **25**, S36–40 (2006).

107. Zhou, S., Chen, J. & Feng, J. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. *Chin. Med. J. (Engl)*. **116**, 788–90 (2003).
108. Li, W., He, H., Kawakita, T., Espana, E. M. & Tseng, S. C. G. Amniotic membrane induces apoptosis of interferon-gamma activated macrophages in vitro. *Exp. Eye Res.* **82**, 282–92 (2006).
109. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, Riethmuller D, Tiberghien P, Humbert P, A. F. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* **15**, 459–64 (2007).
110. Magatti, M., De Munari, S., Vertua, E. & Parolini, O. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2208–18 (2012).
111. Jiao H, Guan F, Yang B, Li J, Song L, Hu X, D. Y. Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis in vivo through the Bcl-2/caspase pathways. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 467–73 (2012).
112. Kang NH, Yi BR, Lim SY, Hwang KA, Baek YS, Kang KS, C. K. Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in BALB/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. *Int. J. Oncol.* **40**, 2022–8 (2012).
113. Niknejad, H., Khayat-Khoei, M. & Peirovi, H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med. Hypotheses* **78**, 690–1 (2012).
114. Niknejad, H. *et al.* Inhibition of HSP90 could be possible mechanism for anti-cancer property of amniotic membrane. *Med. Hypotheses* **81**, 862–5 (2013).
115. Rolfo, A., Giuffrida, D., Giuffrida, M. C., Todros, T. & Calogero, A. E. New perspectives for prostate cancer treatment: in vitro inhibition of LNCaP and PC3 cell proliferation by amnion-derived mesenchymal stromal cells conditioned media. *Aging Male* **17**, 94–101 (2014).
116. Khademi B, Bahranifard H, Azarpira N, B. E. Clinical Application of Amniotic Membrane as a Biologic Dressing in Oral Cavity and Pharyngeal Defects after Tumor Resection. *Arch Iran Med.* **16**, 2011–2014 (2013).
117. Irvani, K., Hashemi, S. B., Tehrani, M. & Rashidi, M. Amniotic Membrane in Reconstruction of larynx Following Chondrosarcoma Resection: a case report. *Am. J. Otolaryngol.* 1–4 (2014). doi:10.1016/j.amjoto.2014.03.007

118. Mamede AC, Laranjo M, Carvalho MJ, Abrantes AM, Pires AS, Brito AF, Moura P, Maia CJ, B. M. Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study. *J. Membr. Biol.* **247**, 357–60 (2014).
119. López, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **849**, 190–202 (2007).
120. Rabilloud, T. & Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J. Proteomics* **74**, 1829–41 (2011).
121. Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior, Gabrielle Rosembli Martins, Igor Ciríaco Barroso, Rebeca Cavalcante Marinho, T. D. de F. A. e M. F. da S. T. Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa como Ferramentas Proteômicas Aplicadas à Definição de Marcadores Proteicos Associados à Eficiência Reprodutiva de Caprinos. *Acta Vet. Bras.* **7**, 100–112 (2013).
122. Guide, H. 2-D Electrophoresis Workflow How-To Guide.
123. Wait, R., Harry, R. A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H. & Dunn, M. J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption / ionization and electrospray ionization- mass spectrometry Proteomics and 2-DE. **1**, (2000).
124. Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* **1**, 1852–8 (2006).
125. Langdon, S. P. *Cancer Cell Culture: Methods and protocols.* (Humana Press, 2004).
126. Liu, Y. Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: From inhibited cellular mtt reduction to altered cellular cholesterol homeostatis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **23**, 377–95 (1999).
127. Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112–6 (2006).
128. Vega-Avila, E. & Pugsley, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **54**, 10–4 (2011).
129. Nandhakumar, S. *et al.* Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2**, 107–11 (2011).
130. Collins, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **26**, (2004).

131. Tice, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206–21 (2000).
132. Guide, A. L. *Introduction to Flow Cytometry*: (2000).
133. Brown, M. & Wittwer, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* **46**, 1221–9 (2000).
134. Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W. & Boon, N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends Biotechnol.* **28**, 416–24 (2010).
135. Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. **281**, 301–311
136. Crissman, H. a & Steinkamp, J. a. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.* **59**, 766–71 (1973).
137. Deitch, a. D., Law, H. & deVere White, R. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 967–972 (1982).
138. Tessema, M., Lehmann, U. & Kreipe, H. Cell cycle and no end. *Virchows Arch.* **444**, 313–23 (2004).
139. Seewoo, V. *et al.* The different induction mechanisms of growth arrest DNA damage inducible gene 45  $\beta$  in human hepatoma cell lines. *Chemotherapy* **58**, 165–74 (2012).
140. Tien, L. T. *et al.* Expression of  $\beta$ -catenin in hepatocellular carcinoma. **11**, 2398–2401 (2005).
141. Yang, Y. & Ma, H. Western Blotting and ELISA Techniques. *Researcher* **1**, 67–86 (2009).
142. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Western blotting. *Methods* **38**, 283–93 (2006).
143. Mahmood, T. & Yang, P.-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–34 (2012).
144. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
145. Krysko, D. V, Vanden Berghe, T., D’Herde, K. & Vandenabeele, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* **44**, 205–21 (2008).

146. Krysko, D. V, Vanden Berghe, T., Parthoens, E., D'Herde, K. & Vandenabeele, P. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol.* **442**, 307–41 (2008).
147. Festjens, N., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1371–87 (2006).
148. Brito, a F. *et al.* Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy* **58**, 381–6 (2012).
149. Ribeiro, M. Nova Abordagem no Tratamento de Tumores Primários do Fígado: o Papel da Quercetina. (2013).
150. Dagrosa, M. A. *et al.* Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **57**, 1084–1092 (2003).
151. Abdallah, B. M. & Kassem, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* **15**, 109–16 (2008).
152. Manuelpillai, U. *et al.* Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplant.* **19**, 1157–68 (2010).
153. Rennie, K. *et al.* Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. *Stem Cells Int.* **2012**, 721538 (2012).
154. Puglisi, M. A. *et al.* Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 860578 (2011).
155. Cargnoni, A. *et al.* Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis. *Cytotherapy* **14**, 153–61 (2012).
156. Temperatures, C. Working with proteins : protein stability and storage - a brief guide Protein structure.
157. Goldberg, S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods Mol. Biol.* **424**, 3–22 (2008).
158. Burden, D. Guide to the Homogenization of Biological Samples A 2012 update of this guide can be found by clicking this link . 1–14 (2012).

159. Martínez-maqueda, D., Hernández-ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B. & Gómez-ruiz, J. Á. *Proteomics in Foods*. 21–51 (Springer US, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-5626-1
160. Sonicação (princípio).pdf.
161. Lodish, H. *et al.* in *Mol. Cell Biol.* (Freeman, W. H.) (2000).
162. Methods, I. T. [73] Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. **423**, 447–454 (1952).
163. Garfin, D. E. Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 263–272 (2003).
164. Jiang, L., He, L. & Fountoulakis, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A* **1023**, 317–320 (2004).
165. Sickmann, A. *et al.* Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **771**, 167–96 (2002).
166. Berridge, M. V, Herst, P. M. & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 127–52 (2005).
167. Vistica, D. T. *et al.* Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability : A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability : A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. 2515–2520 (1991).
168. D, Y. P. M., Ph, D. & D, R. B. D. M. Pharmacological and Therapeutics agents that Target DNA Replication. 1–28
169. Kastan, M. B. & Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316–23 (2004).
170. Williams, G. H. & Stoeber, K. The cell cycle and cancer. *J. Pathol.* **226**, 352–64 (2012).
171. Morin, P. J. Beta-Catenin Signaling and Cancer. *Bioessays* **21**, 1021–30 (1999).
172. Luu, H. H. *et al.* Wnt /  $\beta$  -Catenin Signaling Pathway as Novel Cancer Drug Targets. 653–671 (2004).
173. Fabregat, I., Roncero, C. & Fernández, M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int.* **27**, 155–62 (2007).

174. Azevedo, C. & Sunkel, C. E. *Biologia Celular e Molecular*. (2012).
175. Wu, G., Xu, L., Lin, N. & Liu, B. UCN-01 induces S and G2 / M cell cycle arrest pathways and can suppress invasion in human hepatoma cell lines. 1–9 (2013).
176. Stark, G. R. & Taylor, W. R. Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol. Biol.* **280**, 51–82 (2004).
177. Gump, J. M. & Thorburn, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* **21**, 387–92 (2011).
178. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663–9 (2004).
179. Gillet, R. *et al.* The consequence of p53 overexpression for liver tumor development and the response of transformed murine hepatocytes to genotoxic agents. *Oncogene* **19**, 3498–507 (2000).
180. Niknejad, H. & Yazdanpanah, G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med. Hypotheses* **82**, 488–9 (2014).
181. Ahsan, A. *et al.* Role of EGFR degradation in cisplatin-induced cytotoxicity in head and neck cancer. *Cancer Res* **70**, 2862–2869 (2010).
182. Jiang, H. *et al.* Growth suppression of human hepatocellular carcinoma xenografts by a monoclonal antibody CH12 directed to epidermal growth factor receptor variant III. *J. Biol. Chem.* **286**, 5913–20 (2011).
183. Zhao, P. *et al.* Molecular imaging of hepatocellular carcinoma xenografts with epidermal growth factor receptor targeted affibody probes. *Biomed Res. Int.* **2013**, 759057 (2013).
184. Wilhelm, S. M. *et al.* Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3129–40 (2008).
185. Sugiyama, H. *et al.* Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J. Gastroenterol.* **46**, 779–89 (2011).