



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Membrana amniótica**

## **Uma opção terapêutica para o cancro?**

**Ana Catarina Manjolinha Mamede**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Biomedicina**  
(3º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho  
Co-orientador: Prof. Doutor Cláudio Jorge Maia Baptista

**Covilhã, Maio de 2017**







# Dedicatória

A todos aqueles que ousam na Ciência.

*“O começo de todas as Ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”*

Aristóteles



# Financiamento

Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/73649/2010) financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Projeto financiado pelos programas estratégicos PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013, co-financiados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia e os fundos COMPETE-FEDER; pelo Fundo para a Investigação em Saúde, financiado pelo Infarmed; pelo Banco Santander Totta, no âmbito dos projetos de investigação premiados pelo Gabinete de Apoio à Investigação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; pelo Centro de Investigação em Meio-Ambiente, Genética e Oncobiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

**FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR





# Agradecimentos

Esta tese representa o culminar de um projeto ao qual me propus. No entanto, para a concretização deste trabalho, muitos foram aqueles que contribuíram de diversas formas e que me apoiaram. Por este motivo, quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática e Diretora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por me ter recebido no seio do seu grupo de investigação e me ter permitido aprender muito do que hoje sei. Quero também agradecer a oportunidade que me ofereceu de desenvolver um trabalho numa área ainda em franca expansão, apoiando-me sempre em cada pequena descoberta e impedindo-me de desanimar. A sua orientação, pautada por sábios e pertinentes conselhos, fez de mim uma melhor investigadora e, certamente, também uma melhor pessoa. Obrigado pelas críticas, sugestões e partilha de conhecimento. Obrigado, principalmente, pela amizade.

Ao Professor Doutor Cláudio Jorge Maia, Professor Auxiliar na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e membro integrado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde, por ter aceitado o desafio de coorientar este projeto. O seu conhecimento, profissionalismo, entusiasmo e curiosidade científica foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho experimental. Obrigado pela disponibilidade constante, pela revisão cuidada de todos os documentos e pelas discussões pertinentes sobre os mais variados tópicos.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar e membro da equipa de investigação da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por me ter ensinado diversas técnicas e metodologias, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela revisão cuidada e crítica dos documentos. Obrigado pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, confiança, apoio e amizade ao longo dos últimos anos. Obrigado, principalmente, pelo exemplo de trabalho e dedicação!

À Professora Doutora Mafalda Laranjo, membro da equipa de investigação da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela partilha do entusiasmo sobre a temática da membrana amniótica humana e das suas potenciais aplicações clínicas. Obrigado pelas discussões pertinentes, pela ajuda na elaboração de diversos documentos, pelo apoio laboratorial e pela partilha de conhecimento. Obrigado pelo apoio e amizade, construída pouco a pouco, e que hoje guardo com carinho.

Ao Professor Doutor Artur Paiva, membro da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por ser um dos principais incentivadores deste trabalho. O seu entusiasmo e as suas palavras nunca me deixaram desistir. Ao Professor Doutor Artur Paiva devo um agradecimento sincero por ter acreditado neste projeto desde o primeiro instante. Um obrigado especial à equipa de técnicos da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, em especial ao Mestre Tiago Carvalheiro, que me apoiou na obtenção e interpretação dos resultados adquiridos através da técnica de citometria de fluxo. Obrigado por toda a disponibilidade e simpatia.

Ao Professor Doutor Paulo Moura, Diretor do Serviço de Obstetrícia da Maternidade Daniel de Matos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por ter colaborado neste trabalho e por ter organizado, em conjunto com a sua equipa médica, o processo de recolha do consentimento informado das parturientes e a colheita das membranas amnióticas humanas. Devo um agradecimento especial a toda a equipa de enfermagem e a todos os médicos obstetras que participaram neste trabalho, em especial à Professora Doutora Maria João Carvalho, cuja participação foi de extrema importância neste trabalho. Obrigado pelo apoio em questões de ordem científica. Obrigado pelo apoio na resolução de questões de ordem prática. Pelos comentários e críticas, pela total disponibilidade e, principalmente, pela enorme paciência e amizade.

À Professora Doutora Lígia Prado e Castro, bem como aos técnicos do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por terem colaborado neste trabalho, particularmente na análise *ex vivo* dos tumores. Gostaria de agradecer particularmente ao Mestre Rui Oliveira, médico anatomopatologista do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela sua disponibilidade, simpatia, amizade e alegria contagiante.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, à Professora Doutora Ana Cristina Gonçalves e à Mester Raquel Alves pelo auxílio prestado na execução e análise da técnica de coloração de May-Grünwald-Giemsa. Obrigado pela constante disponibilidade e companheirismo.

À Bayer Healthcare pela disponibilização gratuita do sorafenib, utilizado neste trabalho experimental.

À Cláudia Caridade, Assistente Técnica na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela constante postura resoluta e disponível mas, principalmente, pela simpatia e amizade.

A todos os alunos de Doutoramento com quem tive o prazer de trabalhar na Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Ao João Casalta, pelo apoio na análise estatística e pela constante boa disposição. Ao Fernando Mendes, pela sua forma de estar, alegria constante e exemplo de dedicação. À Sara Ferreira, pelo companheirismo e amizade. Ao Edgar Tavares da Silva, pelo constante entusiasmo no laboratório, pelas ideias, pela motivação e pelo apoio na realização dos estudos *in vivo*.

À Salomé Pires, colega de laboratório e amiga pessoal, com quem tive o prazer de trabalhar. Obrigado pela calma, pela paciência e pela sensatez nos momentos mais críticos. Obrigado pela alegria, boa disposição e motivação em todos os momentos. Partimos juntas, caminhámos a par. Assegurar-me-ei que vou continuar a caminhar ao teu lado.

À Ana Brito, pelo entusiasmo partilhado relativamente ao estudo do carcinoma hepatocelular. Obrigado pela partilha de conhecimento, discussão, críticas e sugestões. Mas, principalmente, obrigado pela presença constante na minha vida pessoal e académica ao longo dos últimos anos. Por cada música cantada desafinadamente em dueto, por cada dança atabalhoada e por cada sorriso cúmplice: obrigado!

A todos os alunos de Licenciatura e Mestrado com quem tive o prazer de privar durante estes últimos anos e que, com as suas sugestões e críticas, contribuíram para este trabalho. À Kathleen Santos, pelo apoio prestado na técnica do ensaio cometa. Ao João Encarnação, pela amizade e apoio inestimável. À Sara Guerra, à Andreia Alves e à Xiao Zhu Jin, por terem partilhado comigo horas intermináveis no laboratório e por terem contribuído para o sucesso deste projeto. Obrigado pelo carinho, pela paciência e pela dedicação de todas vós, com quem tanto aprendi!

À Margarida Gonçalves, à Cátia Vaz, à Micaela Almeida e ao Luís Pedro Rato, pelo apoio e preocupação constantes. Pelo vosso exemplo de trabalho, pela vossa dedicação, pela vossa amizade. Pela vossa presença na minha vida: obrigado!

Ao Humberto e à Maria João, aos Petinga e aos Abreu, por me terem acolhido no seio da vossa família. Obrigado por toda a amizade e apoio!

Ao Puka, pelo amor e amizade. Pelas horas a fio a ver-me trabalhar ao computador, assegurando que as restantes horas eram as melhores do meu dia. Pelas horas tardias a que eu chegava a casa, garantindo um sorriso sempre pronto para me receber. Tenho o resto da vida para te compensar. Fá-lo-ei.

À minha irmã, tão igual e tão diferente. Serás sempre minha e eu tua. Obrigado pelo apoio, pelo cuidado e pela amizade.

Aos meus pais, a quem tudo devo. Pelo apoio, pelo incentivo, pelos sábios conselhos. Pela orientação, mesmo silenciosa, de quem caminha ao meu lado sem me empurrar, mas de quem está preparado para me erguer a cada queda. Não vos faltarei.

À minha avó, a quem nos últimos tempos de vida não pude prestar todo o apoio e atenção que merecia. Por toda a influência que teve na minha vida. Pela derradeira lição que me deixou: que não há nada mais precioso na vida do que a nossa família.

A Deus, que acompanhou e continua a acompanhar os meus passos, e a quem entrego o poder máximo de orientar o meu caminho, acompanhando-me em cada novo trilho.

# Prefácio

A membrana amniótica humana é um tecido largamente utilizado em diversas áreas clínicas, como a oftalmologia ou o tratamento de queimados. No que diz respeito à oncologia, a membrana amniótica humana tem sido alvo de inúmeros estudos durante a última década. Na verdade, foram já publicados trabalhos que reportam o efeito anti-cancerígeno das células derivadas da membrana amniótica humana, ou do meio por ela condicionado, através de modelos *in vitro* e *in vivo* em diversos tipos de tumores.

O cancro representa atualmente um importante problema de saúde pública. Apesar dos avanços que se têm registado no diagnóstico e na terapêutica da doença oncológica, certamente motivados pela multidisciplinaridade e pela complementaridade das equipas médicas e científicas, o cancro continua a ser responsável por elevadas taxas de incidência, de morbilidade e de mortalidade em todo o mundo. Por este motivo, é urgente desenvolver terapêuticas alternativas eficazes, capazes de reduzir as taxas de morbilidade e de mortalidade.

O transplante hepático e a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial são as únicas opções curativas atualmente disponíveis para o carcinoma hepatocelular em estadio inicial. Devido à assintomatologia da doença, o carcinoma hepatocelular é normalmente diagnosticado numa fase avançada não existindo, para tal, terapêuticas curativas adequadas. Neste contexto, é necessário desenvolver terapias eficazes contra este tipo de cancro, podendo a membrana amniótica humana representar uma opção às existentes, que se revelam escassas e pouco eficazes.

Este projeto surge com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos da membrana amniótica humana no cancro, particularmente no carcinoma hepatocelular, um tumor responsável por uma elevada taxa de mortalidade em todo o mundo. Para tal, foram utilizados neste trabalho diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como inúmeras técnicas de biologia celular e molecular.

O trabalho atual vem, pela primeira vez, clarificar o efeito anti-cancerígeno da membrana amniótica humana enquanto tecido na doença oncológica, não considerando apenas os seus derivados (células ou meio condicionado pela membrana amniótica humana). Por outro lado, a terapêutica anti-cancerígena com recurso à membrana amniótica humana no carcinoma hepatocelular, enquanto tecido ou derivados, não havia sido testada até agora.

Esta tese, em que está compilado todo o trabalho experimental realizado no âmbito deste ambicioso projeto, está estruturada em seis capítulos principais:

- **O primeiro capítulo** inclui o estado de arte sobre a membrana amniótica humana, nomeadamente sobre a sua origem e estrutura, as suas funções, as suas propriedades e as aplicações clínicas. É também apresentada uma revisão bibliográfica sobre a relação entre a

membrana amniótica humana e o cancro. Por último, neste capítulo encontra-se também descrita uma revisão da literatura sobre o carcinoma hepatocelular humano, particularmente sobre a sua epidemiologia, etiologia, patofisiologia e formas de tratamento;

- O **segundo capítulo** descreve os principais objetivos estabelecidos para o desenvolvimento deste trabalho experimental;

- No **terceiro capítulo** são descritos os modelos *in vitro* e *in vivo* considerados neste trabalho, bem como as diversas metodologias de biologia celular e molecular utilizadas;

- No **quarto capítulo** podem ser encontrados todos os resultados experimentais obtidos durante a realização deste projeto;

- No **quinto capítulo**, apresenta-se uma discussão sobre o tema e sobre os resultados obtidos no contexto deste trabalho experimental, bem como as perspetivas futuras inerentes;

- Por último, no **sexto capítulo**, são apresentadas as principais conclusões deste trabalho pioneiro.

## Resumo

As propriedades anti-cancerígenas da membrana amniótica humana têm sido investigadas ao longo da última década. Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que as células derivadas da membrana amniótica e meio por ela condicionado poderão vir a ser utilizados na terapia do cancro.

O carcinoma hepatocelular representa atualmente uma importante causa de morte em todo o mundo. O transplante hepático e a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial são as únicas opções curativas atualmente disponíveis para o carcinoma hepatocelular em estadios iniciais. Devido à assintomatologia da doença, o carcinoma hepatocelular é normalmente diagnosticado numa fase avançada não existindo, para tal, terapêuticas curativas adequadas. Neste caso, a quimioterapia e a radioterapia são frequentemente prescritas com o objetivo de aliviar os sintomas associados à normal progressão da doença. Assim sendo, é urgente descobrir novos agentes terapêuticos que se revelem eficazes contra o carcinoma hepatocelular.

Até agora, o efeito da membrana amniótica enquanto tecido não foi investigado na doença oncológica. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos das membranas amnióticas humanas (hAMPE, do inglês *human amniotic membrane protein extracts*) no cancro humano, particularmente no carcinoma hepatocelular, recorrendo para tal a diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como a inúmeras técnicas de biologia celular e molecular.

Os hAMPE foram capazes de inibir a atividade metabólica de diversas linhas celulares de cancro humano, entre as quais o carcinoma hepatocelular. Estudos pormenorizados revelam que os hAMPE são capazes de inibir a atividade metabólica, o conteúdo proteico e o conteúdo de ácido desoxirribonucleico (ADN) nas células de todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, de forma dependente da dose e do tempo de exposição.

O tratamento foi capaz de induzir a morte celular sendo, no entanto, a via de morte induzida dependente do perfil particular de cada linha celular. Desta forma, a via intrínseca da apoptose foi estimulada nas células da linha celular HuH7, tal como confirmado pelo aumento da expressão da razão BAX/BCL2, do citocromo C, da caspase 9 e da caspase 3. Por outro lado, a via extrínseca da apoptose foi induzida pelos hAMPE nas células HepG2 e Hep3B2.1-7. Nas células destas linhas celulares, foi registado um aumento da expressão da caspase 3 e da caspase 8. Nas células da linha celular HepG2 foi também observada necrose tumoral.

Os hAMPE foram capazes de modificar o microambiente tumoral oxidativo de todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular estudadas, bem como o seu ciclo celular. Neste estudo verificou-se que os hAMPE atuaram de forma diferente a nível dos danos no ADN, da P21, da P53, da  $\beta$ -catenina, das proteínas de multirresistência (MDR, do inglês *multidrug*

*resistance*) e dos transportadores de glicose (GLUT, do inglês *glucose transporters*) nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular.

Os hAMPE parecem surtir um efeito potenciador do 5-Fluouracilo (5-FU), da doxorubicina, da cisplatina e do sorafenib, apesar da resposta obtida não ser homogênea entre as linhas celulares consideradas.

Os resultados *in vivo* confirmaram, mais uma vez, que o sucesso da terapia com os hAMPE depende do perfil de cada linha celular.

Os hAMPE apresentaram citotoxicidade seletiva, uma vez que não foram capazes de inibir a atividade metabólica, o conteúdo proteico e o conteúdo de ADN das células de uma linha celular não tumorigênica.

Os resultados obtidos contribuíram para o estudo da terapia anti-cancerígena com recursos às membranas fetais, abrindo novas oportunidades no que à terapia do carcinoma hepatocelular diz respeito. Os nossos resultados sugerem também que as características genéticas e biológicas das linhas celulares são responsáveis pela resposta celular à terapia, tornando claro que as terapias anti-cancerígenas devem ser preferencialmente personalizadas.

## Palavras-chave

Placenta, Membrana amniótica humana, Carcinoma hepatocelular, Morte celular, Quimioterapia.

# Abstract

The anticancer properties of the human amniotic membrane has been investigated over the last decade. *In vitro* and *in vivo* studies showed that the amniotic membrane derived cells and their conditioned medium may play an important role in cancer therapy.

Currently, hepatocellular carcinoma represents a worldwide major cause of death. Liver transplantation and surgical resection by partial hepatectomy are the only curative options available for early stage hepatocellular carcinoma. Due to the lack of symptoms, hepatocellular carcinoma is usually diagnosed at advanced stage. There are no curative therapies for advanced stage hepatocellular carcinoma. In this case, chemotherapy and radiotherapy are often prescribed in order to relieve the symptoms associated with the normal progression of the disease. For all this reasons, it is urgent to discover new and effective therapeutic agents against hepatocellular carcinoma.

Considering that the effect of amniotic membrane as a tissue has not been investigated so far in cancer disease, the aim of this study was to evaluate the effect of human amniotic membrane protein extracts (hAMPE) in human cancer, particularly in hepatocellular carcinoma, using several *in vitro* and *in vivo* models, as well as different cellular and molecular biology techniques.

hAMPE were able to inhibit the metabolic activity of several human cancer cell lines, including hepatocellular carcinoma. Detailed studies showed that hAMPE were able to inhibit the metabolic activity, protein and deoxyribonucleic acid (DNA) content in all hepatocellular carcinoma cell lines in a dose and time dependent manner.

The treatment was able to induce cell death, but the induced death pathway was dependent on the particular profile of each cell line. Thus, the intrinsic apoptosis pathway was stimulated in the cells of the HuH7 cell line, as demonstrated by the increased expression of BAX/BCL2 ratio, cytochrome C, caspase 9 and caspase 3. On the other hand, the extrinsic apoptosis pathway was induced by hAMPE in the Hep3B2.1-7 and HepG2 cells. In these cell lines, there was an increase in the expression of caspase 3 and caspase 8. Regarding HepG2 cell line, tumour necrosis was also observed.

The hAMPE were able to modify the oxidative tumour microenvironment in all hepatocellular carcinoma cell lines, as well as their cell cycle. In this study, it was found that hAMPE act differently in the DNA damage, P21, P53,  $\beta$ -catenin, multidrug resistance proteins (MDR) and glucose transporters (GLUT) of all hepatocellular carcinoma cell lines.

The hAMPE seems to potentiate the effect of 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin, cisplatin and sorafenib, although the response obtained is not homogeneous across all the cell lines.

The *in vivo* results also suggest that the success of hAMPE therapy depends of each cell line profile.

hAMPE presents selective cytotoxicity, since we were not able to inhibit the metabolic activity, protein and DNA content of a non-tumorigenic cell line.

In conclusion, the results obtained in this study contribute to the anti-cancer therapy study with resource to fetal membranes, opening up new opportunities regarding the hepatocellular carcinoma therapy. In addition, the results also suggest that the genetic and biological characteristics of the cell lines are responsible for the cellular response to therapy, making it clear that the anti-cancer therapies should preferably be personalized.

## **Keywords**

Placenta, Human amniotic membrane, Hepatocellular carcinoma, Cell death, Chemotherapy

# Índice

Lista de figuras	xxiii
Lista de tabelas	xxix
Lista de abreviaturas	xxxii
<b>Capítulo 1   Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Membrana amniótica humana	3
1.1.1 Origem e estrutura	3
1.1.2 Funções	7
1.1.3 Propriedades	11
1.1.4 Aplicações	15
1.2 Membrana amniótica humana e cancro	19
1.2.1 Hipótese	19
1.2.2 Evidências	24
1.3 Carcinoma hepatocelular	27
1.3.1 Epidemiologia	27
1.3.2 Etiologia	28
1.3.3 Patofisiologia	31
1.3.4 Tratamento	36
<b>Capítulo 2   Objetivos</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 3   Materiais e métodos</b>	<b>45</b>
3.1 Membrana amniótica humana	47
3.1.1 Colheita	47
3.1.2 Receção	47
3.1.3 Extração e quantificação das proteínas	48
3.2 Culturas celulares	49
3.3 Efeito em vários tipos de cancro	50
3.3.1 Citotoxicidade	50
Atividade metabólica	50
3.4 Efeito no carcinoma hepatocelular	51
3.4.1 Citotoxicidade	51
Atividade metabólica	51
Conteúdo proteico	52
Conteúdo de ácido desoxirribonucleico	53
3.4.2 Viabilidade e morte celular	54
Morfologia	54

Tipos de morte celular	55
3.4.3 Vias de morte celular	57
BAX e BCL2	57
Citocromo C	57
Potencial de membrana mitocondrial	58
Caspases	59
3.4.4 Stresse oxidativo e defesas antioxidantes	61
Peróxido de hidrogénio	61
Radical superóxido	62
Glutathiona	63
3.4.5 Núcleo celular e proteínas reguladoras	63
Danos no ácido desoxirribonucleico	64
i. Ensaio cometa	64
ii. Ensaio de fragmentação com polietileno glicol/Hoechst	66
Ciclo celular	66
Proteína 53	67
Proteína 21	67
Proteína $\beta$ -catenina	68
3.4.6 Transportadores de glicose	68
3.4.7 Proteínas de resistência	69
Glicoproteína P	69
Proteína de multirresistência 1	69
Proteína de resistência pulmonar	70
3.4.8 Terapia combinada	70
3.4.9 Estudos <i>in vivo</i>	71
Modelo animal	72
Terapêutica	72
Análise histopatológica dos tumores	73
3.5 Análise estatística	74
<b>Capítulo 4   Resultados</b>	<b>75</b>
4.1 Membrana amniótica humana	77
4.1.1 Colheita, receção, extração e quantificação das proteínas	77
4.2 Efeito em vários tipos de cancro	77
4.2.1 Citotoxicidade	77
Atividade metabólica	77
4.3 Efeito no carcinoma hepatocelular	79
4.3.1 Citotoxicidade	79
Atividade metabólica	79
Conteúdo proteico	81

Conteúdo de ácido desoxirribonucleico	83
4.3.2 Viabilidade e morte celular	85
Morfologia	85
Tipos de morte celular	87
4.3.3 Vias de morte celular	88
BAX e BCL2	88
Citocromo C	89
Potencial de membrana mitocondrial	90
Caspases	91
Caspase 3	91
Caspase 8	92
Caspase 9	93
4.3.4 Stresse oxidativo e defesas antioxidantes	94
Peróxido de hidrogénio e radical superóxido	94
Glutathiona	95
4.3.5 Núcleo celular e proteínas reguladoras	96
Danos no ácido desoxirribonucleico	96
i. Ensaio cometa	96
ii. Ensaio de fragmentação com polietileno glicol/Hoechst	98
Ciclo celular	98
Proteína 53	99
Proteína 21	100
Proteína $\beta$ -catenina	101
4.3.6 Transportadores de glicose	102
4.3.7 Proteínas de resistência	106
Glicoproteína P	106
Proteína de multirresistência 1	107
Proteína de resistência pulmonar	108
4.3.8 Terapia combinada	109
4.3.9 Estudos <i>in vivo</i>	113
Modelo animal e terapêutica	113
Análise histopatológica dos tumores	115
<b>Capítulo 5   Discussão e perspectivas futuras</b>	<b>117</b>
<b>Capítulo 6   Conclusões</b>	<b>137</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>143</b>

Lista de publicações relacionadas com a tese	169
Artigos em revistas com arbitragem científica	171
Livros publicados	172
Capítulos de livros publicados	172
Resumos em revistas com arbitragem científica	172
Apresentação oral de trabalhos	173
Anexos	177
Anexo A - Parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	179
Anexo B - Parecer favorável do Conselho de Administração do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	180

# Lista de figuras

Figura 1.1 - Formação do blastocisto (página 3)

Figura 1.2 - Alterações morfológicas no embrioblasto (página 4)

Figura 1.3 - Aspeto macroscópico (A) e microscópico (B) da membrana amniótica humana de uma gestação de termo (página 5)

Figura 1.4 - Funções da membrana amniótica humana (página 10)

Figura 1.5 - Cicatrização de úlcera corneana e conjuntival após transplante da membrana amniótica humana (página 16)

Figura 1.6 - Terapia anti-angiogénica (página 20)

Figura 1.7 - Via apoptótica intrínseca e extrínseca (página 22)

Figura 1.8 - A administração intra-tumoral de hAMCs inibe o crescimento de gliomas, obtidos através da inoculação heterotópica das células C6 em ratinhos atímicos (página 26)

Figura 1.9 - Fatores de risco para o carcinoma hepatocelular (página 29)

Figura 1.10 - Hepatocarcinogénese (página 32)

Figura 1.11 - Principais vias de sinalização alteradas durante o processo de hepatocarcinogénese (página 33)

Figura 1.12 - Via de sinalização canónica do Wnt (página 35)

Figura 3.1 - Receção das membranas amnióticas (página 48)

Figura 3.2 - Técnica do MTT (página 51)

Figura 3.3 - Deteção da apoptose com recurso à anexina V (página 55)

Figura 3.4 - Deteção da necrose com recurso ao iodeto de propídeo (página 56)

Figura 3.5 - *Western blot* (página 61)

Figura 3.6 - Detecção de peróxido de hidrogénio (página 62)

Figura 3.7 - Ensaio cometa (página 65)

Figura 3.8 - Ratinho BALB/c-nude (página 72)

Figura 4.1 - Atividade metabólica (%) das células de várias linhas celulares de cancro humano após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 78)

Figura 4.2. - Atividade metabólica (%) das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C), após 24 horas e 72 horas de incubação com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 79)

Figura 4.3 - Conteúdo proteico (%) das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 24 horas e 72 horas de incubação com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 82)

Figura 4.4 - Conteúdo de ADN (%) nas células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 24 horas e 72 horas de incubação com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 84)

Figura 4.5 - Morfologia das células das linhas celulares HuH7 (I e II), HepG2 (III e IV) e Hep3B2.1-7 (V e VI) após 72 horas de incubação na ausência (I, III e V) e na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (II, IV e VI) (página 86)

Figura 4.6 - Apoptose e necrose nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 87)

Figura 4.7 - Razão BAX/BCL2 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 88)

Figura 4.8 - Expressão do citocromo C nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 89)

Figura 4.9 - Razão monómeros/agregados (M/A) nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 90)

Figura 4.10 - Expressão da caspase 3 (32kDa) nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 91)

Figura 4.11 - Expressão da caspase 8 (55kDa) nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 92)

Figura 4.12 - Expressão da caspase 9 (46kDa) nas células da linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 93)

Figura 4.13 - Produção de peróxido de hidrogénio e de radical superóxido pelas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 94)

Figura 4.14 - Expressão da GSH nas células da linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 95)

Figura 4.15 - Integridade do ADN avaliada qualitativamente através do ensaio cometa na linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 (página 97)

Figura 4.16 - Integridade do ADN avaliada quantitativamente através do ensaio cometa na linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 97)

Figura 4.17 - Fragmentação do ADN nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 98)

Figura 4.18 - Análise do ciclo celular das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 99)

Figura 4.19 - Expressão da P53 nas células das linhas celulares HuH7 e HepG2 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 100)

Figura 4.20 - Expressão da P21 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 101)

Figura 4.21 - Expressão da β-catenina nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 102)

Figura 4.22 - Expressão do GLUT1 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 103)

Figura 4.23 - Expressão do GLUT2 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 104)

Figura 4.24 - Expressão do GLUT3 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 104)

Figura 4.25 - Expressão do GLUT5 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 105)

Figura 4.26 - Expressão do GLUT12 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 105)

Figura 4.27 - Expressão da PGP nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 106)

Figura 4.28 - Expressão da MRP1 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 107)

Figura 4.29 - Expressão da LRP1 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE (página 108)

Figura 4.30 - Atividade metabólica (%) das células da linha celular HuH7 após 72 horas de terapia combinada com 0,5µg/µL de hAMPE e com 166,62µM de 5-FU, ou com 0,1µM de doxorubicina (Doxo), ou com 1,51µM de cisplatina (Cis) ou com 9,53µM de sorafenib (Sora) (página 110)

Figura 4.31 - Atividade metabólica (%) das células linha celular HepG2 após 72 horas de terapia combinada com 0,5µg/µL de hAMPE e com 18,9µM de 5-FU, ou com 0,29µM de doxorubicina (Doxo), ou com 2,04µM de cisplatina (Cis) ou com 4,63µM de sorafenib (Sora) (página 111)

Figura 4.32 - Atividade metabólica (%) da linha celular Hep3B2.1-7 após 72 horas de terapia combinada com 0,1µg/µL de hAMPE e com 88,3µM de 5-FU, ou com 0,4µM de doxorubicina (Doxo), ou com 2,9µM de cisplatina (Cis) ou com 4,60µM de sorafenib (Sora) (página 112)

Figura 4.33. - Taxa de crescimento tumoral dos xenotransplantes obtidos através da inoculação de células da linha celular HuH7 em ratinhos que não foram sujeitos a qualquer tratamento (grupo 1 -controle) e em ratinhos sujeitos a terapia com os hAMPE (grupo 2 - tratamento) (página 113)

Figura 4.34 - Taxa de crescimento tumoral dos xenotransplantes obtidos através da inoculação de células da linha celular HepG2 em ratinhos que não foram sujeitos a qualquer tratamento (grupo 3 -controle) e em ratinhos sujeitos a terapia com os hAMPE (grupo 4 - tratamento) **(página 114)**

Figura 4.35 - Hábito interno após a terapia com o hAMPE em animais com xenotransplantes após inoculação com células das linhas celulares HuH7 (A) e HepG2 (B), com particular ênfase nos pulmões (II e VI), fígado (III e VII) e baço (IV e VIII) **(página 115)**

Figura 4.36 - Análise histopatológica dos xenotransplantes obtidos a partir de ratinhos inoculados com células da linha celular HuH7 **(página 116)**

Figura 4.37 - Análise histopatológica de xenotransplantes obtidos a partir de ratinhos inoculados com células da linha celular HepG2 **(página 116)**

Figura 6.1 - Efeitos *in vitro* e *in vivo* dos hAMPE nas células da linha celular HuH7 **(página 139)**

Figura 6.2 - Efeitos *in vitro* e *in vivo* dos hAMPE nas células da linha celular HepG2 **(página 140)**

Figura 6.3 - Efeitos *in vitro* dos hAMPE nas células da linha celular Hep3B2.1-7 **(página 141)**



## Lista de tabelas

Tabela 3.1 - Anticorpos utilizados na técnica de *western blot* para detecção das caspases (página 60)

Tabela 3.2 - IC50 ( $\mu\text{M}$ ) dos fármacos utilizados na terapia combinada (página 71)

Tabela 4.1 - Atividade metabólica (%) das células das linhas celulares HFF1, HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 81)

Tabela 4.2 - Conteúdo proteico (%) das células das linhas celulares HFF1, HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 83)

Tabela 4.3 - Conteúdo de ADN (%) nas células das linhas celulares HFF1, HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (página 85)



## Lista de abreviaturas

<b>5-FU</b>	<i>5-Fluorouracilo</i>
<b>ADN</b>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<b>AIF</b>	<i>Apoptosis inducing factor</i>
<b>Akt/FKHR</b>	<i>Protein kinase B/ forkhead transcription factor foxo 1</i>
<b>Apaf-1</b>	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
<b>APC</b>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>AQP</b>	<i>Aquaporinas</i>
<b>ARN</b>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>BAD</b>	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
<b>BAX</b>	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>BCL-10</b>	<i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i>
<b>BCL-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BCL-XL</b>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<b>BCL-XS</b>	<i>B-cell lymphoma-extra short</i>
<b>bFGF</b>	<i>Basic-fibroblast growth factor</i>
<b>BID</b>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
<b>BIK</b>	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
<b>BLK</b>	<i>B lymphocyte kinase</i>
<b>BRCA1</b>	<i>Breast cancer 1 protein</i>
<b>CA</b>	<i>Carbonic anhydrase</i>
<b>CAD</b>	<i>Caspase-activated DNase</i>
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
<b>CFC-1</b>	<i>Criptic family 1</i>
<b>CRH</b>	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
<b>DCF</b>	<i>2',7'-diclorofluoresceína</i>
<b>DCFH-DA</b>	<i>2',7'-diclorofluoresceína diacetato</i>
<b>DHE</b>	<i>Dihydroethidium</i>
<b>DISC</b>	<i>Death-inducing signaling complex</i>
<b>DLC-1</b>	<i>Deleted in liver cancer 1</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<b>DPPA-3</b>	<i>Developmental pluripotency-associated protein 3</i>
<b>DSMZ</b>	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>

<b>DTT</b>	<i>Ditiotreitol</i>
<b>ECACC</b>	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
<b>ECF</b>	<i>Elemental chlorine free</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<b>FADD</b>	<i>Fas-associated death domain</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i>
<b>FGF-4</b>	<i>Fibroblast growth factor 4</i>
<b>FITC</b>	<i>Isotiocianato de fluoresceína</i>
<b>FLT3</b>	<i>Fms-related tyrosine kinase</i>
<b>FZD-9</b>	<i>Frizzled family receptor 9</i>
<b>GCTM-2</b>	<i>Germ cell tumor marker 2</i>
<b>GLUT</b>	<i>Glucose transporter</i>
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
<b>GPx</b>	<i>Glutathione peroxidase</i>
<b>GSH</b>	<i>Glutathione</i>
<b>GSSG</b>	<i>Glutathione oxidada</i>
<b>H&amp;E</b>	<i>Hematoxilina e eosina</i>
<b>hAECs</b>	<i>Human amniotic membrane epithelial cells</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>HEPES</b>	<i>N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanossulfónico)</i>
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor</i>
<b>HGFR</b>	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigens</i>
<b>HSP90</b>	<i>Heat shock protein 90</i>
<b>HUVECs</b>	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferão <math>\gamma</math></i>
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<b>IGFR</b>	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
<b>IL</b>	<i>Interleucina</i>
<b>JC-1</b>	<i>5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina</i>
<b>JCRB</b>	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
<b>KGF</b>	<i>Keratinocyte growth factor</i>
<b>KLF-4</b>	<i>Kruppel-like factor 4</i>
<b>LRP</b>	<i>Lung resistance-related protein</i>
<b>MAPK/ERK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated</i>

	<i>kinases</i>
<b>MCL-1</b>	<i>Myeloid cell leukemia1</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
<b>MDR</b>	<i>Multidrug resistance</i>
<b>MIF</b>	<i>Macrophage migration-inhibitory factor</i>
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i>
<b>MRP1</b>	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>MTT</b>	<i>3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio</i>
<b>NAD</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADPH</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>
<b>NF-KB</b>	<i>Nuclear factor KB</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>
<b>OCT-4</b>	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
<b>P15</b>	<i>Proteína 15</i>
<b>P16</b>	<i>Proteína 16</i>
<b>P21</b>	<i>Proteína 21</i>
<b>P53</b>	<i>Proteína 53</i>
<b>P73</b>	<i>Proteína 73</i>
<b>PARP</b>	<i>Poly(ADP-ribose)polymerase</i>
<b>PAX-6</b>	<i>Paired box gene 6</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCNA</b>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PEDF</b>	<i>Pigment epithelial-derived factor</i>
<b>PEG</b>	<i>Polietileno glicol</i>
<b>PGP</b>	<i>P-glycoprotein</i>
<b>PI3K/Akt</b>	<i>Phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B</i>
<b>PMM</b>	<i>Potencial da membrana mitocondrial</i>
<b>PROM-1</b>	<i>Prominina 1</i>
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog protein</i>
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene fluorid</i>
<b>Rb</b>	<i>Proteína do retinoblastoma</i>
<b>RET</b>	<i>Rearranged during transfection</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radioimunoprecipitação</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

<b>SLPI</b>	<i>Secretory leucocyte proteinase inhibitor</i>
<b>SMAC</b>	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
<b>SMAD</b>	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
<b>SOCS-1</b>	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
<b>SOD</b>	<i>Superóxido dismutase</i>
<b>SOX2</b>	<i>SRY (sex determining region Y) box 2</i>
<b>SPCAL</b>	<i>Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório</i>
<b>SRB</b>	<i>Sulforodamina B</i>
<b>SSEA</b>	<i>Stage-specific embryonic antigen</i>
<b>STRO-1</b>	<i>Stromal cell surface marker 1</i>
<b>TACE</b>	<i>Transarterial chemoembolization</i>
<b>TAE</b>	<i>Transarterial embolization</i>
<b>TBST-BSA</b>	<i>Tris-buffered saline tween-20 - bovine serum albumine</i>
<b>TCF/LEF</b>	<i>T-cell factor/ lymphoid enhancer-binding</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
<b>TNFR</b>	<i>Tumor necrosis factor receptors</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>TRX</b>	<i>Tioredoxina</i>
<b>VDAC</b>	<i>Voltage-dependent anion channels</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
<b>VHB</b>	<i>Vírus da hepatite B</i>
<b>VHC</b>	<i>Vírus da hepatite C</i>
<b>VIH</b>	<i>Vírus da imunodeficiência humana</i>





# Capítulo 1

## Introdução



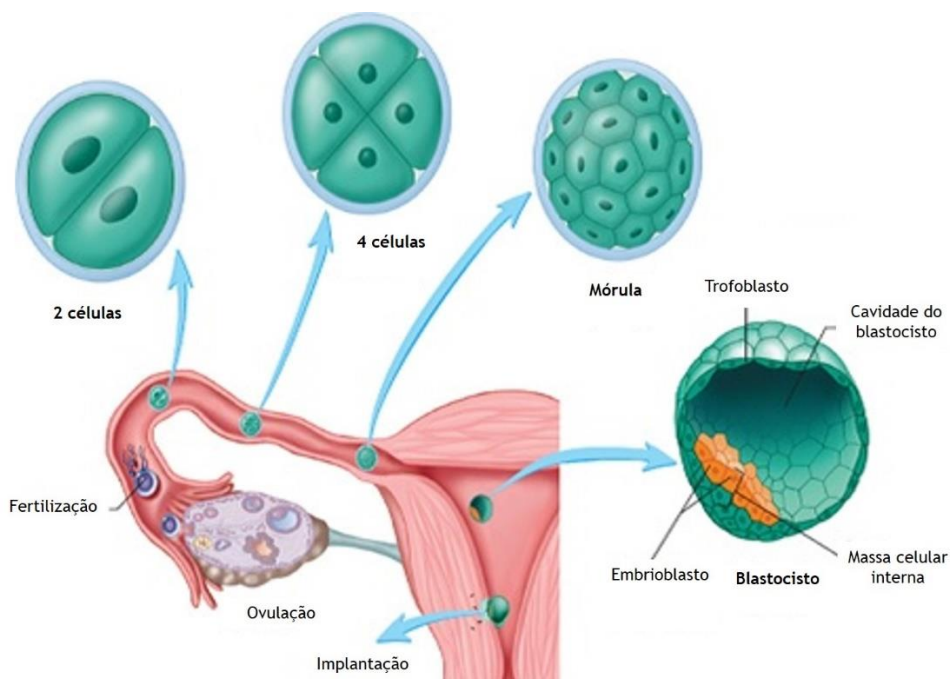
# 1.1 Membrana amniótica humana

## 1.1.1 Origem e estrutura

A relação entre o embrião/feto e a mãe é uma das características mais relevantes do desenvolvimento humano. Esta relação é mantida através da placenta, um tecido responsável por sustentar o normal desenvolvimento e sobrevivência do embrião/feto durante todo o período gestacional (Barros 2015; Mamede et al. 2012).

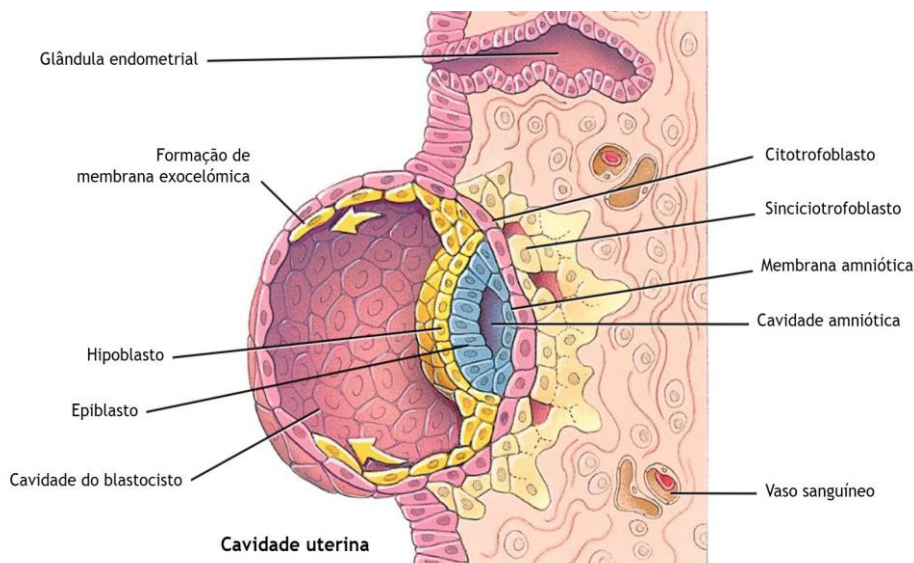
A placenta é composta por duas camadas: uma exterior, denominada por córion e subjacente às células maternas, e uma interna, denominada por membrana amniótica. A membrana amniótica é uma fina membrana que envolve completamente o embrião/feto e delimita a cavidade amniótica que é, por sua vez, preenchida pelo líquido amniótico (Pollard et al. 1976; Mamede et al. 2012).

Após a fecundação, ocorre a repetida divisão mitótica do zigoto, dando origem à formação de uma esfera constituída por células totipotentes, designada por mórula. Aproximadamente ao quinto dia após a fecundação, a mórula origina o blastocisto, que consiste numa estrutura esférica delimitada por células trofoblásticas dispostas numa única camada. No interior do blastocisto, existem também células dispostas em várias camadas num único polo, sendo esta estrutura denominada por embrioblasto, tal como revelado na figura 1.1 (Seeley et al. 2003; Moore & Persaud 2008; Barros 2015).



**Figura 1.1** - Formação do blastocisto. O blastocisto tem origem na mórula e é constituído pelo trofoblasto (células a verde) e pelo embrioblasto (células a laranja). Adaptado de (Seeley et al. 2003).

Após a implantação do blastocisto no endométrio, as células trofoblásticas diferenciam-se em duas camadas: uma camada externa e invasiva denominada por sinciotrofoblasto, e uma camada interna denominada por citotrofoblasto. Durante este processo, ocorrem também alterações morfológicas no embrioblasto, que dá origem a um disco embrionário composto por duas camadas: o epiblasto, adjacente ao trofoblasto, e o hipoblasto, tal como representado na figura 1.2. O epiblasto é responsável por originar a cavidade amniótica, sendo esta delimitada por células derivadas do próprio epiblasto, denominadas por amnioblastos.

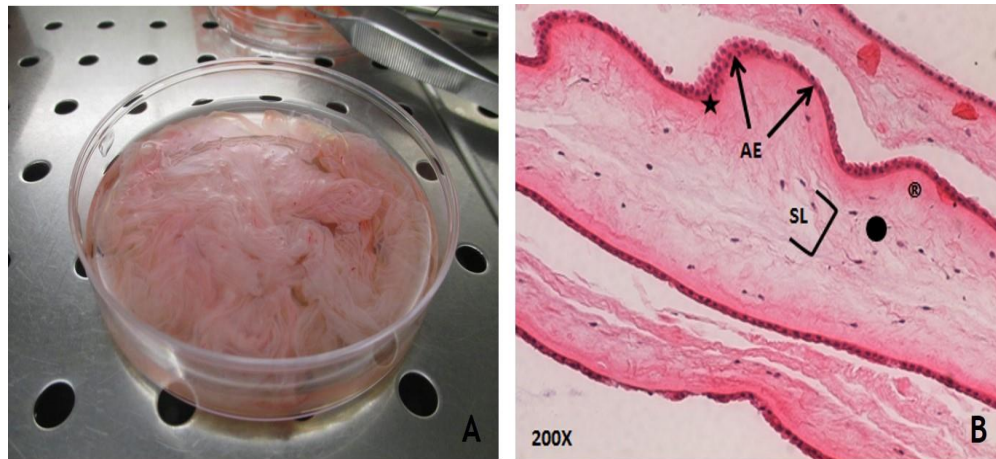


**Figura 1.2** - Alterações morfológicas no embrioblasto. O embrioblasto origina o hipoblasto e o epiblasto, que dá por sua vez origem à cavidade amniótica. Adaptado de (Stribley 2015).

Os amnioblastos são responsáveis pela formação do epitélio da membrana amniótica. Por outro lado, as células do hipoblasto dão origem à membrana exocelômica ou de Heuser, enquanto a cavidade do blastocisto origina, por sua vez, o saco vitelino. As células da membrana exocelômica e o trofoblasto adjacente originam o retículo extraembrionário. Como resultado, algumas células do hipoblasto migram ao longo do retículo extraembrionário com o objetivo de formar um tecido conectivo, denominado por mesoderme extraembrionária, que rodeia o saco vitelino e a cavidade amniótica e que origina, conseqüentemente, a mesoderme amniótica. Quando o líquido amniótico começa a acumular-se no interior da cavidade amniótica, ocorre a expansão gradual da membrana amniótica, que acaba por aderir à superfície interna do córion na ausência de fusão histológica (Seeley et al. 2003; Moore & Persaud 2008; Barros 2015; Baradaran-Rafii et al. 2007; Evangelista et al. 2008).

Após a ocorrência de uma enorme variedade de complexos eventos embriológicos, a membrana amniótica surge como um fino, resistente e translúcido tecido que não possui músculos, nervos ou vasos linfáticos. A espessura da membrana amniótica pode variar entre 20µm a 50µm. Este tecido é constituído por três camadas histologicamente distintas: a

camada epitelial, a membrana basal e a camada mesenquimal, podendo esta ser subdividida em folheto compacto, folheto fibroblástico e folheto esponjoso, tal como mostrado na figura 1.3 (Kang, Hwang, et al. 2012; Niknejad et al. 2008; Evangelista et al. 2008; Kesting et al. 2014; Baradaran-Rafii et al. 2007; Caruso et al. 2013; Rocha & Baptista 2015; Areia & Moura 2015).



**Figura 1.3** - Aspeto macroscópico (A) e microscópico (B) da membrana amniótica humana de uma gestação de termo. Este tecido translúcido e avascular é composto pela camada epitelial [AE], a membrana basal [★] e a camada mesenquimal, que é comumente subdividida no folheto compacto [®], fibroblástico [●] e esponjoso [SL]. Coloração com hematoxilina e eosina (H&E) (200x). (A) - Propriedade da autora; (B) - Retirado de (Rocha & Baptista 2015).

A camada epitelial, adjacente à cavidade amniótica e ao líquido amniótico, é constituída por uma monocamada homogénea e ininterrupta de células epiteliais cubóides colunares, que se encontram firmemente fixadas à membrana basal (Sadler 2000; Chopra & Thomas 2013; Evangelista et al. 2008). Estas células, denominadas por células epiteliais da membrana amniótica (hAECs, do inglês *human amniotic membrane epithelial cells*), estão lateralmente ligadas por desmossomas. O polo apical das hAECs está em contacto direto com o espaço luminal, enquanto o polo basal está em contacto com a membrana basal. A superfície apical das hAECs possui um elevado número de microvilosidades, o que provavelmente confere às hAECs uma participação ativa no transporte intracelular e transcelular, bem como funções ativas de secreção. As hAECs possuem um citoesqueleto bem formado e altamente funcional, núcleos grandes e irregulares, muitos organelos intracitoplasmáticos e abundantes vesículas pinocíticas. Os nucléolos são frequentemente grandes e homogéneos, sugerindo uma elevada atividade nuclear (Sadler 2000; Pollard et al. 1976; Baradaran-Rafii et al. 2007; Caruso et al. 2013; Chopra & Thomas 2013; King 1980; Rocha & Baptista 2015).

Após isolamento celular, diversos estudos revelaram que a maioria das hAECs expressam citoqueratinas, o que confirma o seu perfil epitelial. Sabe-se, no entanto, que as hAECs expressam também alguns marcadores mesenquimais e hematopoiéticos, incluindo o CD10, o CD13, o CD29, o CD44, o CD49e, o CD73, o CD90 (Thy-1), o CD105, o CD166 e o

marcador de superfície de células do estroma do tipo 1 (STRO-1, do inglês *stromal cell surface marker 1*) (Caruso et al. 2015; Mamede et al. 2012; Parolini et al. 2008).

A membrana basal da membrana amniótica, sobre a qual assentam as células epiteliais, é a principal responsável pela tensão e pela resistência elástica que permite a este tecido distender durante todo o período gestacional e resistir aos vigorosos movimentos do embrião/feto. A membrana basal é composta principalmente por colagénio, por fibronectina e por laminina, contendo também na sua estrutura elastina e proteoglicanos. Na membrana basal podem igualmente ser encontradas moléculas como a  $\alpha$ -actinina, a espectrina, a ezrina, inúmeras citoqueratinas, a vimentina e a desmoplaquina (King 1985; Wolf et al. 1991; Caruso et al. 2013; Bryant-Greenwood 1998; Malak et al. 1993; Rocha & Baptista 2015).

O colagénio é um importante componente estrutural da membrana amniótica, tal como revelado pelos estudos de extração e de caracterização, bem como pela sua imunolocalização específica (Bryant-Greenwood 1998; Kanayama et al. 1985). As isoformas mais abundantes de colagénio na membrana amniótica são a I, a III, a IV, a V, a VI e a VII (Caruso et al. 2013). Sabe-se que a resistência tracional, a integridade mecânica e elastância da membrana amniótica estão maioritariamente relacionadas com a expressão de colagénio do tipo I e do tipo III, isoformas altamente predominantes neste tecido, assim como com a expressão de elastina (Baradaran-Rafii et al. 2007; Kanayama et al. 1985; Niknejad et al. 2008; Malak et al. 1993; Sadler 2000).

A fibronectina é uma glicoproteína responsável por manter a estrutura da membrana amniótica devido aos seus múltiplos domínios de ligação a recetores proteicos da membrana celular, as integrinas, bem como aos componentes da matriz extracelular. Tal só é conseguido devido aos domínios especializados capazes de mediar a adesão celular (Baradaran-Rafii et al. 2007).

A laminina e as suas isoformas, principalmente a 1, a 2, a 4, a 5, a 6, a 7, a 10 e a 11, secretadas pelas hAECs, contribuem largamente para a diferenciação, a forma e o movimento celular, bem como para a manutenção do fenótipo tecidual e para a sua sobrevivência através de recetores, como as integrinas e os distroglicanos. Das isoformas referidas, a laminina 5 é a mais abundante na membrana amniótica (Chopra & Thomas 2013; Baradaran-Rafii et al. 2007; Takashima et al. 2008).

A camada externa da membrana amniótica, conhecida por camada mesenquimal, pode ser subdividida em três folhetos, o compacto, o fibroblástico e o esponjoso, tal como previamente referido e ilustrado na figura 1.3. O folheto compacto forma o principal esqueleto fibroso da membrana amniótica, enquanto o folheto fibroblástico é rico em células conhecidas por células mesenquimais da membrana amniótica (hAMCs, do inglês *human amniotic membrane mesenchymal cells*) e alguns macrófagos (Caruso et al. 2013). As hAMCs apresentam uma morfologia fusiforme e elevada mobilidade.

Em termos de caracterização fenotípica, as hAMCs expressam os marcadores CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD166 e STRO-1 (Caruso et al. 2013; Caruso et al. 2015; In 't Anker et al. 2004; Soncini et al. 2007).

O folheto esponjoso encontra-se adjacente ao córion e é assim denominado devido à elevada abundância de proteoglicanos e de glicoproteínas. Tal abundância resulta numa aparência histológica esponjosa. O colagénio, particularmente do tipo III, encontra-se abundantemente expresso no folheto esponjoso (Niknejad et al. 2008; Baradaran-Rafii et al. 2007; Chopra & Thomas 2013; Rocha & Baptista 2015).

Vale a pena referir que o perfil biofísico, fisiológico, genético e histológico da membrana amniótica varia ao longo do período gestacional e entre gestantes, pelo que podemos observar padrões distintos. Porém, como a maioria dos estudos documentam a caracterização de membranas amnióticas obtidas de gravidezes de termo, provenientes de gestações sem complicações obstétricas, muito pouco se sabe sobre o perfil deste tecido em estadios iniciais ou intermédios do período gestacional (Mamede et al. 2012; Marvin et al. 2002; Abrantes et al. 2015; Benson-Martin et al. 2006; Kanayama et al. 1985; Areia & Moura 2015; Browne & Veall 1953; Many et al. 2001; Zusterzeel et al. 2001).

### 1.1.2 Funções

As funções da membrana amniótica humana estão maioritariamente relacionadas com processos de transporte, de metabolização, de regulação endócrina e de proteção. Vale a pena referir que as funções da membrana amniótica não podem ser separadas das funções do córion e, conseqüentemente, de toda a placenta. O conhecimento destas funções deve-se maioritariamente aos estudos efetuados com membranas amnióticas de gravidezes de termo, tal como referido anteriormente. No entanto, acredita-se que as funções deste tecido sejam substancialmente diferentes ao longo dos vários estadios gestacionais (Gude et al. 2004; Abrantes et al. 2015).

A membrana amniótica é altamente permeável ao oxigénio e ao dióxido de carbono. Por este motivo, a difusão do oxigénio do sangue materno para o do embrião/feto e a difusão do dióxido de carbono do sangue do embrião/feto para o materno, ocorre rapidamente. Em comparação com a hemoglobina materna, a hemoglobina embrio-fetal possui uma elevada afinidade para o oxigénio e uma baixa afinidade para o dióxido de carbono, favorecendo assim a transferência do oxigénio para o embrião/feto e a transferência do dióxido de carbono para a gestante. Sabe-se que a difusão dos gases através da membrana amniótica pode ser limitada pelo fluxo sanguíneo (Moore & Persaud 2008; Gude et al. 2004; Al-Asmakh et al. 2007; Campbell et al. 1966).

A glicose é o principal hidrato de carbono que circula através da membrana amniótica humana e representa a principal fonte de energia para o embrião/feto. Após atravessar a membrana amniótica, a glicose pode ser convertida em glicose-6-fosfato ou em glicogénio. Por sua vez, a glicose-6-fosfato pode ser utilizada na respiração aeróbia ou anaeróbia, bem como na via das pentoses-fosfato. A expressão de transportadores de glicose (GLUT, do inglês *glucose transporter*) na membrana amniótica torna possível o transporte mediado deste

hidrato de carbono. A presença do GLUT1 e do GLUT3 na superfície apical das hAECs foi já descrita, sendo que o GLUT1 é considerado o maior responsável pelo transporte de glicose através da membrana amniótica humana (Wolf & Desoye 1993). Relativamente à expressão do GLUT4, um transportador de glicose que responde à insulina, têm surgido na literatura estudos contraditórios. Wolf e Desoye não encontraram o GLUT4 expresso na membrana amniótica humana (Wolf & Desoye 1993). No entanto, Xing et al. afirmaram que o GLUT4 é expresso na membrana amniótica e que é relevante para o transporte da glicose e na conversão desta em glicogénio, como resposta à insulina presente na circulação embrio-fetal (Xing et al. 1998). Para além dos transportadores de glicose referidos, também o GLUT8 e o GLUT12 se encontram expressos na membrana amniótica humana (Gude et al. 2004; Moore & Persaud 2008; Malek et al. 1996; Wolf & Desoye 1993; Herrmann et al. 1985; Gude et al. 2005; Gude et al. 2003).

O embrião/feto produz grandes quantidades de lactato. Por este motivo, pensa-se que a membrana amniótica possa desempenhar um importante papel na remoção do lactato da circulação embrio/fetal (Gude et al. 2004; Moore & Persaud 2008; Malek et al. 1996; Burd et al. 1975; Palaćin et al. 1985; Schaefer et al. 1993; Herrmann et al. 1985)

Os aminoácidos são essenciais para a síntese proteica, podendo também ser metabolizados diretamente pelo embrião/feto. A concentração entre os aminoácidos encontrados no plasma embrio-fetal em relação à do plasma materno pode variar entre 1 e 4, indicando um elevado transporte de aminoácidos da circulação materna para a circulação embrio-fetal (Gude et al. 2004; Moore & Persaud 2008).

A concentração de lípidos aumenta ao longo do período gestacional no líquido amniótico. No plasma, muitos lípidos encontram-se ligados a proteínas, formando os denominados complexos lipoproteicos. Uma vez que a superfície da placenta contém lipase lipoproteica, capaz de libertar os lípidos dos complexos lipoproteicos, os ácidos gordos podem atravessar livremente a membrana amniótica humana, através de um processo de difusão simples. Adicionalmente, o transporte de ácidos gordos através da membrana amniótica pode também ser mediado pela ação de proteínas associadas à membrana, responsáveis por determinar a direção do transporte e a concentração de ácidos gordos no líquido amniótico (Moore & Persaud 2008; Pritchard et al. 1968; Gunasegaram et al. 1985; Foster & Das 1984).

Sabe-se que a membrana amniótica é capaz de sintetizar glicolípidos a partir do glicerol-3-fosfato, ácidos gordos e outros precursores. Em cultura, as células do trofoblasto revelaram conseguir sintetizar ácido oleico, palmítico e palmitoleico e, de uma forma mais limitada, ácido esterático, mirístico e láurico. Porém, apesar da membrana amniótica poder sintetizar colesterol, em condições normais, o colesterol embrio-fetal provém da circulação materna (Olson & Hons 1985; Moore & Persaud 2008; Pritchard et al. 1968; Gunasegaram et al. 1985; Foster & Das 1984).

Devido à imaturidade do fígado embrio-fetal, a membrana amniótica assume parte das suas funções, excretando ácidos biliares, pigmentos biliares e vários xenobióticos. As

vitaminas são igualmente transferidas da circulação materna para a circulação embrio-fetal, bem como muitos minerais, como é o caso do ferro (Moore & Persaud 2008; Gude et al. 2004).

O transporte de água através da membrana amniótica depende das pressões hidrostática e osmótica entre a cavidade amniótica e a circulação embrio-fetal. Presume-se que a água atravesse a membrana amniótica de forma passiva e que a sua transferência seja mediada pelas aquaporinas (AQP). As AQP são proteínas transmembranares que regulam o influxo e o efluxo da água, bem como de pequenos solutos. Na membrana amniótica encontram-se expressos três subgrupos da família de AQP: as AQP clássicas (AQP1 e AQP8), as aquagliceroporinas (AQP3 e AQP9) e as super AQP (AQP11). O padrão de expressão das AQP sugere o transporte citoplasmático e transmembranar da água através de todas as AQP, bem como de outras moléculas (ureia, glicerol, amónia e solutos neutros) no caso das aquagliceroporinas (Rocha & Baptista 2015). A regulação do transporte de água é extremamente importante para a manutenção da homeostasia e para o controlo do volume do líquido amniótico.

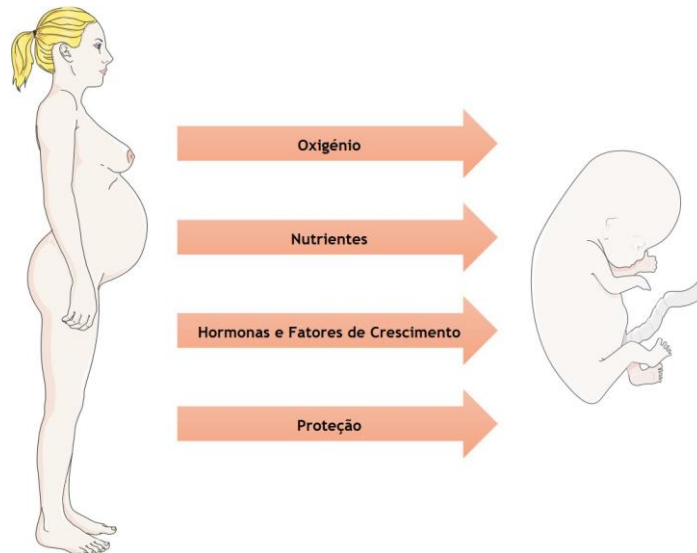
As concentrações de sódio e de cloreto no sangue materno e embrio-fetal são similares, enquanto as concentrações de potássio, de cálcio e de fosfato são superiores no sangue embrio-fetal. O potássio, o magnésio, o cálcio e o fosfato são transportados ativamente. Por outro lado, pensa-se que o transporte de sódio e de cloreto ocorra de forma passiva (Moore & Persaud 2008; Gude et al. 2004; Qi et al. 2009; Wang et al. 2006; Hussain et al. 2007; Rocha & Baptista 2015).

O desenvolvimento embrionário depende da ação de vários fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos produzidos pela membrana amniótica humana, como por exemplo os estrogénios, a progesterona, a gonadotrofina coriónica (hCG, do inglês *human chorionic gonadotropin*), o lactogénio placentário e diversos fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF, do inglês *insulin-like growth factor*) do tipo I e do tipo II e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*). Também as citocinas, as quimiocinas, os eicosanóides, os autacóides vasoativos, as proteínas de origem placentária associadas à gravidez, a hormona libertadora de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*), a hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH, do inglês *gonadotropin-releasing hormone*) e muitos outros fatores são produzidos pela membrana amniótica.

A membrana amniótica sintetiza substâncias que induzem e mantêm a contractilidade uterina. As prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E2 e as enzimas integradas na síntese de prostaglandinas, são algumas das moléculas produzidas pelo epitélio da membrana amniótica e que possuem um papel efetivo na fisiologia do parto (Mamede et al. 2012).

Este tecido produz também grandes quantidades de acetilcolina, que se pensa ter um importante papel na proliferação, na migração e na diferenciação celular, bem como na organização do citoesqueleto, no contacto célula-célula e na função imunitária (Gude et al. 2004; Moore & Persaud 2008).

Uma das funções básicas da membrana amniótica humana é oferecer ao embrião/feto um ambiente de proteção e de suspensão, onde este possa crescer livre da pressão das estruturas que o rodeiam e onde possa executar com liberdade os seus movimentos, tal como ilustrado na figura 1.4 (Mamede et al. 2012; Gude et al. 2004).



**Figura 1.4** - Funções da membrana amniótica humana. A membrana amniótica é responsável pelo transporte de oxigênio, de nutrientes, de hormonas e de fatores de crescimento da circulação materna para a circulação embrião-fetal, bem como por oferecer um ambiente de proteção e de suspensão ao embrião/feto. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

A manutenção do pH do líquido amniótico, num valor entre 7,0 e 7,5, é também uma das funções essenciais da membrana amniótica. A existência de anidrase carbónica (CA, do inglês *carbonic anhydrase*), particularmente as isoformas CA-1 e CA-2, na camada epitelial da membrana amniótica é responsável pela rápida conversão do dióxido de carbono e água em ácido carbónico (Moore & Persaud 2008; Gude et al. 2004; Mamede et al. 2012).

A membrana amniótica humana é também responsável por proteger o embrião/feto do efeito dos xenobióticos, que podem atravessar este tecido por difusão simples ou através de sistemas de transporte. A membrana amniótica pode ajudar a reduzir a transferência destas substâncias tóxicas através de bombas de efluxo, como a proteína de multirresistência 1 (MRP1, do inglês *multidrug resistance protein 1*), que se encontram expressas neste tecido. A membrana amniótica expressa também enzimas do sistema do citocromo P450, responsáveis por metabolizar diversos fármacos e xenobióticos (Gude et al. 2004; Leazer & Klaassen 2003; Prouillac & Lecoœur 2010).

A membrana amniótica forma uma barreira contra a transmissão de bactérias da gestante para o embrião/feto. Infelizmente, e apesar da existência desta barreira, algumas bactérias e vírus podem ser transmitidos através da mesma, como o vírus da imunodeficiência humana (VIH), o citomegalovírus, a rubéola e a varicela (Gude et al. 2004).

### 1.1.3 Propriedades

A membrana amniótica humana possui inúmeras e multifacetadas propriedades, o que largamente tem determinado o interesse da comunidade médica e científica neste tecido.

As propriedades estaminais das células derivadas da membrana amniótica têm incitado o estudo da sua aplicação na área da medicina regenerativa, particularmente na regeneração neural, hepática, cardiomiogénica, condrocitária, pulmonar e pancreática (Toda et al. 2007; Caruso et al. 2015). Pensa-se que o perfil estaminal das células derivadas da membrana amniótica esteja relacionado com a origem da ectoderme amniótica no epiblasto, que é responsável por originar as três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) do embrião (Caruso et al. 2015).

Inúmeros estudos têm provado que as hAECs expressam inúmeros marcadores estaminais, como o antígeno embrionário estadio-específico (SSEA, do inglês *stage-specific embryonic antigen*) do tipo 3 e do tipo 4, o TRA-1-60, o TRA-1-81, a proteína de ligação ao octâmero 4 (OCT-4, do inglês *octamer-binding transcription factor 4*), a SOX2 [do inglês *SRY (sex determining region Y) box 2*], o NANOG, o REX-1, o fator de crescimento fibroblástico do tipo 4 (FGF-4, do inglês *fibroblast growth factor 4*), o marcador tumoral de células germinativas do tipo 2 (GCTM-2, do inglês *germ cell tumor marker 2*), o CFC-1 (do inglês *criptic family 1*), a proteína associada ao desenvolvimento de pluripotência do tipo 3 (DPPA-3, do inglês *developmental pluripotency-associated protein 3*), a prominina 1 (PROM-1) e a PAX-6 (do inglês *paired box gene 6*). Estudos indicam ainda que algumas hAECs expressam CD117 (c-kit). No entanto, não foi detetada expressão ou atividade relativa à telomerase nas hAECs (Miki et al. 2005; Takashima et al. 2004; Caruso et al. 2015; Niknejad et al. 2008; Insausti et al. 2014).

Relativamente à expressão de marcadores estaminais nas hAMCs, têm sido reportados até agora estudos contraditórios. Kim e os seus co-autores (Kim et al. 2007) revelaram que as hAMCs expressam SSEA-3, SSEA-4, OCT-4 e REX-1. Por outro lado, Nogami e os seus colegas (Nogami et al. 2012) revelaram que as hAMCs expressam SOX-2, mas que apenas um número limitado destas células são positivas para o OCT-3/-4, o KLF-4 (do inglês *Kruppel-like factor 4*) e o SSEA-4. Outros autores revelaram ainda que a expressão genética de OCT-3/-4, SSEA-4, SOX2, NANOG-3, REX-1, FGF-4 e recetor 9 da família frizzled (FZD-9, do inglês *frizzled family receptor 9*) diminuiu nas hAMCs após várias passagens em cultura (Fatimah et al. 2013; Bilic et al. 2008; Caruso et al. 2015; Insausti et al. 2014).

Vários autores confirmaram que as hAECs e as hAMCs possuem capacidade clonogénica, uma característica das células estaminais, e que são também capazes de se diferenciar em inúmeros tipos de células. No entanto, as hAECs e as hAMCs foram incapazes de formar teratomas após inoculação em ratinhos imunodeficientes e em doentes, sugerindo tal facto que estas células não são pluripotentes. A ausência de formação de tumores após o transplante destas células representa uma enorme vantagem no que diz respeito à sua

potencial aplicação clínica (Caruso et al. 2015; Mamede et al. 2012; In 't Anker et al. 2004; Corradetti et al. 2013; Parolini et al. 2008; Evangelista et al. 2008; Miki et al. 2005; Lopes et al. 2015).

A membrana amniótica humana possui propriedades anti-inflamatórias, não sendo os mecanismos que medeiam esta ação ainda totalmente conhecidos. Pensa-se que a membrana amniótica pode servir de barreira física, confinando as células inflamatórias à área afetada e reduzido assim os mediadores inflamatórios (Baradaran-Rafii et al. 2007; Liu et al. 2012). Shimmura e colegas (Shimmura et al. 2001) verificaram que os linfócitos T ficam retidos na membrana amniótica após a sua aplicação sobre a superfície ocular de doentes.

Para além de a sua estrutura promover a ação anti-inflamatória, sabe-se também que as células derivadas da membrana amniótica não expressam, ou expressam residualmente, tal como indicam diversos estudos, os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leukocyte antigens*) A, B, C, DR, assim como a microglobulina  $\beta 2$  (Adinolfi et al. 1982; Caruso et al. 2015; Mamede et al. 2012). Tal facto resulta numa reduzida imunogenicidade. Em contrapartida, a membrana amniótica expressa diferencialmente os HLA de classe I, em especial o HLA-G, que se sabe ter um importante papel na tolerância imunitária durante a gravidez. A resposta imunológica após o transplante da membrana amniótica humana é negligenciável, tal como demonstrado em voluntários humanos que não revelaram quaisquer sinais clínicos de rejeição aguda (Caruso et al. 2015; Kamiya et al. 2005; Khalpey et al. 2015).

Foi provado que as células derivadas da membrana amniótica humana secretam diferentes citocinas, fatores de crescimento e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP, do inglês *tissue inhibitors of metalloproteinases*), que largamente condicionam a resposta anti-inflamatória da membrana amniótica (Steed et al. 2008; Mamede et al. 2012). A expressão de TIMP, principalmente do tipo 1, 2, 3 e 4, pode explicar em parte a ação anti-inflamatória da membrana amniótica, uma vez que as metaloproteinases da matriz (MMP, do inglês *matrix metalloproteinases*) são expressas em células polimorfonucleares infiltrantes e em macrófagos (Caruso et al. 2013). Sabe-se atualmente que as hAECs secretam o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF, do inglês *macrophage migration-inhibitory factor*) (Caruso et al. 2013).

A membrana amniótica é capaz de inibir as células aloreativas T e a produção de diversas citocinas (Ueta et al. 2002). Para além disto, a atividade anti-inflamatória da membrana amniótica julga-se estar ainda relacionada com o antagonista do recetor da interleucina (IL) do tipo 1 e 10. Estas citocinas, com elevada ação anti-inflamatória, são capazes de contrariar a ação de diferentes citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (Fernandes et al. 2005; Caruso et al. 2013; Toda et al. 2007; Mamede et al. 2012; Parolini et al. 2014; Insausti et al. 2014).

A membrana amniótica produz também inibina e activina, proteínas com elevado efeito anti-inflamatório (Caruso et al. 2013; Gomes et al. 2005). A lactoferrina, expressa na

membrana amniótica, é uma proteína anti-bacteriana que exerce simultaneamente um efeito anti-inflamatório, servindo como antioxidante e quelante de ferro (Gomes et al. 2005).

A membrana basal da membrana amniótica possui elevadas concentrações de ácido hialurônico. Após junção deste ao CD44, um marcador expresso nas células inflamatórias, ocorre a inibição da ação destas células. Por outro lado, este polissacárido pode ligar-se ao inibidor inter- $\alpha$  da tripsina, um inibidor da protease, formando um complexo ativo responsável por diversos efeitos anti-inflamatórios (Higa et al. 2005).

Também o meio condicionado obtido a partir da cultura de células derivadas da membrana amniótica mostrou possuir propriedades anti-inflamatórias. Tal foi revelado através da inibição da atividade quimiotática de neutrófilos e de macrófagos, bem como da redução da proliferação e da indução da apoptose em células T e B (Fernandes et al. 2005).

As propriedades anti-microbianas e anti-virais da membrana amniótica são também determinadas pela sua função como barreira natural, uma vez que este tecido adere à superfície das feridas e queimaduras e reduz a infiltração bacteriana, mas também devido à expressão de inúmeras moléculas que determinam estas propriedades, tal como a cistatina E (Mamede et al. 2012; Talmi et al. 1991; Ferng et al. 2016).

As propriedades hemostáticas das fibras de colagénio, abundantemente presentes na membrana amniótica, impedem a formação de hematomas, reduzindo a acumulação microbiana e o risco de infeção (Baradaran-Rafii et al. 2007; Ferng et al. 2016). Por outro lado, a adesão da membrana amniótica à superfície das feridas evita a formação de um espaço em que a secreção serosa se pode acumular, impedindo assim a infeção (Baradaran-Rafii et al. 2007).

Desta forma, este fino e flexível tecido promove a reepitelização, através da secreção de diversos fatores de crescimento, apresenta boa adesão a feridas, permite a redução da perda do calor ou fluidos das feridas e reduz a dor experienciada pelos doentes (Caruso et al. 2013; Mamede et al. 2012). Os fatores de crescimento produzidos pela membrana amniótica humana, importantes para o processo de reepitelização, incluem o EGF, o fator de crescimento transformante (TGF, do inglês *transforming growth factor*), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF, do inglês *keratinocyte growth factor*), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *basic-fibroblast growth factor*) (Caruso et al. 2013; Koizumi et al. 2000).

As células derivadas da membrana amniótica produzem  $\beta$ -defensinas, especialmente do tipo  $\beta$ 3, que são péptidos anti-microbianos (Mamede et al. 2012; Niknejad et al. 2008). O inibidor da protease libertada por leucócitos (SLPI, do inglês *secretory leucocyte proteinase inhibitor*) e a elafina são também responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias e anti-microbianas da membrana amniótica humana (Niknejad et al. 2008; Gomes et al. 2005; Ferng et al. 2016).

O efeito anti-fibrótico da membrana amniótica humana pode ser explicado devido à ação inibitória deste tecido na expressão do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , do

inglês *transforming growth factor  $\beta$* ), responsável por ativar os fibroblastos que, por sua vez, são responsáveis pelo processo de cicatrização. Como resultado, o processo fibrótico é inibido (Hao et al. 2000; Mamede et al. 2012). Desta forma, a membrana amniótica pode modular a cicatrização através da promoção da reconstrução tecidual, em detrimento da formação de uma cicatriz (Gomes et al. 2005; Manuelpillai et al. 2010).

Pensa-se que a atividade anti-angiogénica da membrana amniótica humana possa ser controlada por dois tipos de processos. O primeiro processo pode estar relacionado com a elevada concentração de proteínas da matriz extracelular presentes na membrana amniótica, tal como o colagénio do tipo IV e do tipo VII, a laminina 1 e a laminina 5, a fibronectina, a angiostatina e a endostatina, que estão envolvidas na supressão da neovascularização (Caruso et al. 2013). O segundo processo pode estar relacionado com a produção de fatores anti-angiogénicos pelas células da membrana amniótica. Tais fatores incluem a trombospondina-1, o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF, do inglês *pigment epithelial-derived factor*) e as TIMP (Shao et al. 2004; Caruso et al. 2013). A trombospondina-1 participa na comunicação célula-célula e na comunicação célula-matriz extracelular, tendo sido já implicada na mediação da adesão, da proliferação, da diferenciação, da migração e na apoptose celular. Esta proteína controla vários processos fisiológicos relacionados com a resposta inflamatória e com a angiogénese (Hopkinson et al. 2006).

Vale a pena referir que alguns autores demonstraram que a membrana amniótica produz também alguns fatores angiogénicos, que incluem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), o bFGF, o PDGF, a IL-8, a IL-6, a angiogenina e o interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Caruso et al. 2013). Wolbank e colaboradores revelaram que o método de preparação da membrana amniótica, bem como a sua criopreservação, afeta substancialmente o perfil angiogénico deste tecido, o que pode explicar os diferentes resultados reportados até agora por diferentes autores (Wolbank et al. 2009).

A atividade pro-apoptótica da membrana amniótica humana foi recentemente descoberta. Estudos indicam que a incubação de neutrófilos polimorfonucleares com o meio condicionado pela membrana amniótica aumenta o número de células apoptóticas em cultura, confirmando assim que este tecido é capaz de diminuir a inflamação (Mamede et al. 2012; Caruso et al. 2013; Toda et al. 2007; Hopkinson et al. 2006; Seo et al. 2008). Sabe-se também que a apoptose promovida pela membrana amniótica não é diretamente mediada pelo óxido nítrico ou pelo TNF- $\alpha$ , mas sim pela interrupção da via de sobrevivência do fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ , do inglês *nuclear factor  $\kappa B$* ) e da via de sobrevivência da Akt-FKHR (do inglês *protein kinase B/forkhead transcription factor foxo 1*). As hAECs expressam o ligando Fas, que está envolvido na apoptose de muitos tipos de células podendo, por isso, também estar provavelmente envolvido na apoptose mediada pelas hAECs (Caruso et al. 2013; Seo et al. 2008; Mamede et al. 2012).

Após a colheita, a placenta é normalmente descartada e incinerada. Desta forma, a membrana amniótica poder ser facilmente obtida após o parto, sem recurso a procedimentos

adicionais. A colheita, a criopreservação e a utilização da membrana amniótica humana apresenta um elevado custo-benefício em termos de preparação, de armazenamento e de aplicação em comparação com outros biomateriais disponíveis no mercado. Este tecido não envolve graves problemas éticos, sendo a sua colheita apenas sujeita à aprovação da Comissão de Ética local e à assinatura de um consentimento informado por parte da gestante (Caruso et al. 2013; Oliveira & Pereira 2015; Laranjo 2015; Mamede et al. 2012)

### **1.1.4 Aplicações**

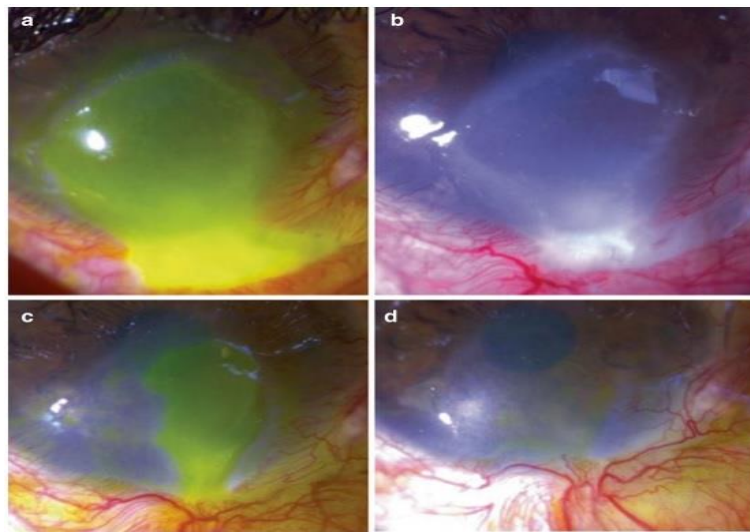
A membrana amniótica humana possui inúmeras aplicações clínicas. De facto, a primeira aplicação clínica da membrana amniótica surgiu em 1910, quando Davis decidiu utilizar as membranas fetais, compostas pela membrana amniótica e pelo córion, como biomaterial para a pele, aplicando-as em feridas e em úlceras (Davis 1910). Três anos mais tarde, Stern and Sabella relataram a utilização das membranas fetais no tratamento de queimaduras na pele e de feridas superficiais (Stern 1913; Sabella 1913). Desde então, a membrana amniótica tem revelado ser bastante útil e eficaz no tratamento de diferentes condições patológicas na área da dermatologia, incluindo em queimaduras, em feridas pós-traumáticas da pele e em úlceras cutâneas (Halim et al. 2015; Mamede et al. 2012). As propriedades que ditam a aplicabilidade deste fino, leve, transparente e elástico tecido na clínica incluem o seu baixo preço, elevada disponibilidade, efeito anti-bacteriano, redução da dor, adesão às feridas e potencial de reepitelização (Toda et al. 2007; Halim et al. 2015). A membrana amniótica adere às feridas através de ligações fibrina-elastina, protegendo a frágil superfície da ferida e, simultaneamente, é capaz de fornecer um ambiente húmido que promove a reepitelização e a proteção do novo epitélio formado (Halim et al. 2015; Koob et al. 2013; Sawhney 1989).

Em 1940, Rötth utilizou a membrana amniótica humana para reconstrução do tecido conjuntivo ocular (Rötth 1940). Posteriormente, Sorsby e Symons relataram a utilização da membrana amniótica em queimaduras graves da superfície ocular, tendo pela primeira vez surgido a ideia de que a membrana amniótica talvez pudesse possuir propriedades biológicas, adicionalmente à sua ação enquanto barreira física, que pudessem explicar os bons resultados obtidos (Sorsby & Symons 1946). No entanto, a ideia de aplicar a membrana amniótica na área da oftalmologia só se tornou verdadeiramente popular após Kim e Tseng terem divulgado resultados auspiciosos nesta área, no ano de 1995 (Kim & Tseng 1995). Os autores utilizaram a membrana amniótica humana para tratar a deficiência límbica num modelo experimental. Os investigadores confirmaram que a membrana amniótica pode facilitar a epitelização, sendo por isso particularmente útil na reconstrução da superfície ocular (Kim & Tseng 1995).

Uma enorme variedade de características, tal como a promoção da reepitelização e os efeitos anti-inflamatório, anti-fibrótico e anti-angiogénico, tornam a membrana amniótica clinicamente útil na área da oftalmologia. Também as suas propriedades físicas,

particularmente a sua fina espessura, suavidade e transparência, ditam a sua utilidade (Toda et al. 2007; Mamede et al. 2012; Shao et al. 2004).

Atualmente, a membrana amniótica é aplicada em diversas patologias da córnea (úlceras, perfurações, queratopatia bolhosa, deficiência aguda ou crônica das células estaminais do limbo, queratopatia em banda), tal como ilustrado na figura 1.5, em patologias da conjuntiva (pterígio, simbléfaro, reconstrução da conjuntiva), no glaucoma, no estrabismo, em oculoplastia e em outras patologias oftálmicas (Costa & Murta 2015; Gomes et al. 2005; Dua & Azuara-Blanco 1999; Fernandes et al. 2005).



**Figura 1.5** - Cicatrização de úlcera corneana e conjuntival após transplante da membrana amniótica humana (a-d). Retirado de (Costa & Murta 2015).

Clinicamente, e particularmente na área da oftalmologia, a membrana amniótica humana sem epitélio pode ser utilizada no interior da lesão. Neste caso, as células epiteliais crescem sobre a membrana basal da membrana amniótica, a qual se incorporará no tecido hospedeiro. Este modelo serve de suporte para o crescimento celular das células epiteliais do limbo, da conjuntiva e da córnea, através da facilitação da migração epitelial e da diferenciação, prevenindo assim a apoptose e reforçando a adesão celular (Costa & Murta 2015; Mamede et al. 2012; Gomes et al. 2005).

Quando colocada sobre a superfície ocular, a membrana amniótica protege o epitélio danificado da ação mecânica das pálpebras e, simultaneamente, serve como barreira anti-inflamatória. Neste caso, a membrana amniótica humana não incorpora o tecido hospedeiro, podendo ser removida após alguns dias. A membrana basal é colocada em contacto com a superfície ocular para estimular o crescimento epitelial, podendo cobrir toda a superfície ocular ou parte dela, dependendo da patologia (Costa & Murta 2015; Mamede et al. 2012; Gomes et al. 2005; Dua & Azuara-Blanco 1999).

Considerando a aplicação ginecológica da membrana amniótica, esta pode ser utilizada no tratamento da síndrome de Asherman e em vaginoplastias. A síndrome de Asherman,

também conhecida por sinéquias uterinas ou adesões intrauterinas, é definida pela presença de adesões intra-uterinas que se formam durante a cicatrização de defeitos na superfície endometrial e que podem, parcial ou completamente, obliterar a cavidade uterina. Para resolver este problema, que induz amenorreia, infertilidade e outras complicações ginecológicas, tem sido considerada a histeroscopia. Ensaios clínicos indicam que a membrana amniótica humana, quando aplicada após lise histeroscópica, pode reduzir a recorrência das adesões intrauterinas e melhorar a regeneração endometrial (Carvalho 2015; Amer & Abd-El-Maeboud 2006; Amer et al. 2010).

Por outro lado, a ideia de usar a membrana amniótica humana para reconstrução vaginal baseia-se no facto destes tecidos partilharem uma estrutura histológica similar, caracterizada por uma camada superficial, intermédia e profunda. Até agora, esta técnica foi utilizada em vaginoplastias resultantes de ausência congénita da vagina e de atresia vaginal total ou parcial (Tancer et al. 1979; Dhall 1984; Zafar et al. 2007; Werner & Piazza 1997; Nisolle & Donnez 1992; Fotopoulou et al. 2010; Carvalho 2015).

A membrana amniótica tem também encontrado aplicações na medicina oral e maxilo-facial, particularmente no tratamento de feridas, tratamento de defeitos na mucosa oral, reconstrução de fístula oronasal, reconstrução da mucosa nasal e cirurgia da articulação temporomandibular (Ferreira & Carrilho 2015; Kesting et al. 2014).

Para além das áreas clínicas previamente referidas, a membrana amniótica é também já clinicamente utilizada na prevenção de adesões pós-operatórias do abdómen e cabeça (Caruso et al. 2013; Dua & Azuara-Blanco 1999; Carvalho 2015; Ferreira & Carrilho 2015; Kesting et al. 2014; Chopra & Thomas 2013).

Para além das atuais aplicações clínicas da membrana amniótica humana, inúmeros estudos são anualmente divulgados sobre novas e ambiciosas aplicações para este tecido. Entre elas encontra-se a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos com recurso às propriedades estaminais das células derivadas da membrana amniótica humana (Parolini et al. 2008; Nogami et al. 2012; Tamagawa et al. 2004; Kim et al. 2007; Caruso et al. 2015). No que diz respeito à doença hepática, diversos estudos já provaram que as células derivadas da membrana amniótica humana se podem diferenciar em hepatócitos (Marongiu et al. 2011; Tamagawa et al. 2007).

Recentemente, Lin et al. revelaram que as hAECs transplantadas num modelo animal de cirrose foram capazes de, mediante diferenciação hepática, expressarem albumina humana (Lin et al. 2015)

Zhang et al. verificaram que as hAMCs foram capazes de reduzir a fibrose hepática e, conseqüentemente, melhorar os parâmetros funcionais do fígado num rato com cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono. Os autores verificaram também a supressão da ativação de células hepáticas estreladas, a diminuição da apoptose e da senescência hepatocitária, bem como o aumento da regeneração hepática após o implante das hAMCs (Zhang et al. 2011).

Manuelpillai e os seus colegas decidiram verificar o efeito das hAECs na inflamação e na fibrose hepática. Para tal, as hAECs foram implantadas por infusão em ratos imunocompetentes com fibrose induzida por tetracloreto de carbono, tendo sido posteriormente detetada albumina humana no soro dos ratos tratados. Foi também detetado ácido desoxirribonucleico (ADN) humano no fígado, no baço, nos pulmões e no coração de alguns dos animais intervencionados. Relativamente à fibrose hepática, observou-se a diminuição dos níveis de alanina transaminase e da apoptose hepatocitária após o tratamento com as hAECs. Foi possível constatar que, em comparação com o grupo controlo, os ratos tratados com as hAECs apresentaram diminuição do TNF- $\alpha$  e da IL-6, bem como o aumento da expressão de IL-10. Foi registado o decréscimo de fibrose, a deposição de colagénio e do número de células hepáticas estreladas ativadas (Manuelpillai et al. 2010). O mesmo grupo de investigadores utilizou o modelo animal já descrito e encontrou, quatro semanas após o implante das hAECs, células humanas no fígado murino. As hAECs revelaram ser capazes de diminuir a área fibrótica e, simultaneamente, de diminuir a ativação de células hepáticas estreladas e a expressão de TGF-B1. O transplante de hAECs permitiu diminuir a infiltração de células T e o número de macrófagos. Adicionalmente, os ratos submetidos a tratamento revelaram uma baixa expressão hepática da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*) (Manuelpillai et al. 2012).

Vários autores têm também utilizado fragmentos de membrana amniótica humana para investigar o seu efeito na doença hepática. Um pedaço de membrana amniótica foi aplicado em ratos com fibrose biliar induzida pela obstrução do ducto biliar comum. Os ratos sujeitos a tratamento revelaram redução da severidade da patologia, redução da deposição de matriz extracelular, diminuição da reação ductular e decréscimo do número de células hepáticas estreladas ativadas e de miofibroblastos ativados. No grupo experimental, sujeito a tratamento, a fibrose ficou confinada à área portal/periportal. Este estudo sugere que a membrana amniótica pode ser utilizada sob a superfície hepática, protegendo este órgão contra o dano hepático associado à degeneração fibrótica. O mesmo estudo foi realizado recorrendo a fragmentos de membrana amniótica criopreservados, tendo sido obtidos resultados experimentais similares (Sant'Anna et al. 2011; Ricci et al. 2011).

Cargnoni e colegas têm também investigado a possibilidade de utilizar fragmentos de membrana amniótica fresca para tratar a isquemia cardíaca. Para tal, os autores aplicaram fragmentos de membrana amniótica no ventrículo esquerdo de ratos com isquemia cardíaca, e verificaram a preservação das dimensões e da função contráctil cardíaca em termos de fração de ejeção ventricular e de espessura do ventrículo esquerdo (Cargnoni et al. 2009).

Têm surgido na literatura resultados que indicam que a membrana amniótica pode também ser útil na regeneração e na reparação de cartilagem e de osso, servindo como substrato para a proliferação e para a diferenciação de condrócitos (Díaz-Prado et al. 2010; Jin et al. 2007; Wei et al. 2009).

Atualmente, a membrana amniótica representa também uma opção, que está a ser explorada, para a regeneração e para a reparação de nervos (Ozgenel & Filiz 2004; Meng et

al. 2011). Neste contexto, Burgers et al. utilizaram a membrana amniótica humana, associada ao fator de crescimento nervoso (NGF, do inglês *nerve growth factor*), como suporte para o crescimento de nervos de ratos com nervos cavernosos danificados, restaurando assim a ereção peniana aos animais (Burgers et al. 1991).

Suspeita-se também que a membrana amniótica humana possa vir a ser utilizada para entrega de fármacos, tais como anti-infecciosos, antibióticos ou anti-virais, tal como sugerido em alguns estudos *in vitro* (Mencucci et al. 2006; Mencucci et al. 2011).

Na última década surgiu também no seio da comunidade médica e científica a ideia de utilizar a membrana amniótica como opção terapêutica para o cancro devido às propriedades anti-angiogénicas, anti-inflamatórias e pro-apoptóticas deste biomaterial (Seo et al. 2008). Tal ideia proveio do conhecimento obtido relativamente às funções e às propriedades da membrana amniótica, mas também da experiência obtida após a aplicação deste tecido em diversas áreas clínicas, como a oftalmologia e a dermatologia (Seo et al. 2008; Toda et al. 2007; Kang, Hwang, et al. 2012).

## 1.2 Membrana amniótica humana e cancro

### 1.2.1 Hipótese

O cancro é a segunda causa de morte nos países desenvolvidos (Siegel et al. 2016; Ferlay, Steliarova-Foucher, et al. 2013). Este facto está largamente relacionado com fatores ambientais e com o aumento dos comportamentos de risco, tais como a adoção de estilos de vida sedentários, dietas não equilibradas e o consumo de álcool e de tabaco (Danaei et al. 2005).

O cancro caracteriza-se, de forma geral, pela divisão celular descontrolada. Tal comportamento deve-se a um conjunto de alterações genéticas que afetam as vias de sinalização responsáveis pelo controlo do crescimento, da proliferação e da morte celular. À medida que a carcinogénese ocorre, o microambiente envolvente evolui para um estado em que a comunicação parácrina é constante, dando origem a um circuito de sinalização altamente dinâmico. Como resultado, o cancro pode adquirir um fenótipo migratório, com invasão dos tecidos circundantes. As células cancerígenas tornam-se assim incapazes de respeitar os limites do tecido envolvente, podendo migrar e dar origem a metástases à distância. Desta forma, na ausência de uma ação terapêutica adequada e atempada, as alterações funcionais e anatómicas induzidas pelo cancro podem determinar a morte do doente (Pietras & Östman 2010; Hanahan & Weinberg 2011).

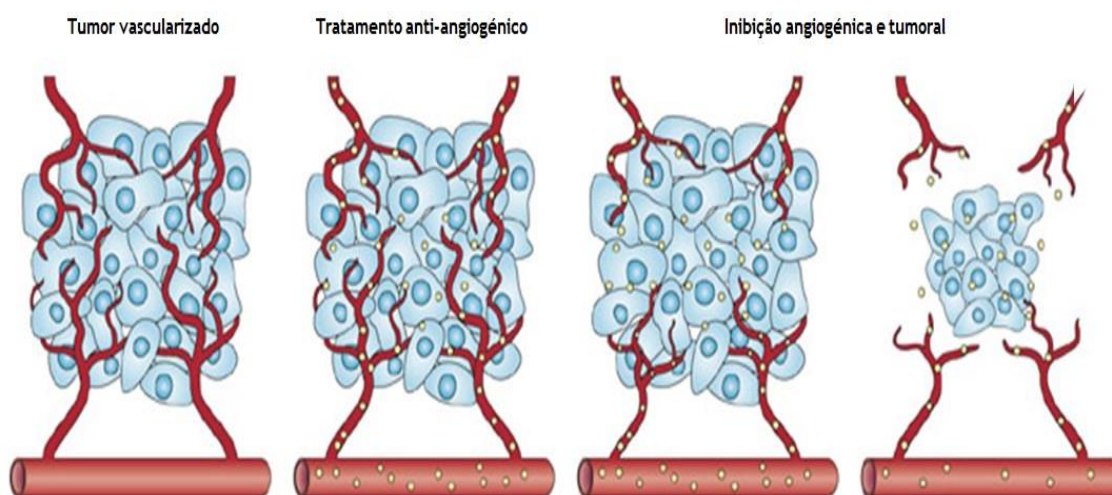
Sabe-se que as células tumorais são dotadas de diversas características, tais como a capacidade de indução angiogénica, a resistência à morte celular, a capacidade de promoção da inflamação, o potencial replicativo ilimitado, a capacidade metastática e de invasão

tecidual, a capacidade de evasão a fatores supressores, a capacidade proliferativa, a capacidade de evasão à destruição imunitária, a instabilidade e/ou mutações genômicas e a energética celular desregulada (Hanahan & Weinberg 2011; Hanahan & Weinberg 2000).

O crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da rede vascular pré-existente é denominado por angiogênese. Este processo é extremamente importante no contexto do desenvolvimento da carcinogênese, desempenhando um papel crucial na proliferação, na metastização e na invasão tecidual. Através dos novos vasos sanguíneos, as células tumorais podem receber oxigênio e outros nutrientes, bem como disseminar-se para outros órgãos (Mamede et al. 2015; Mazitschek & Giannis 2004).

A ideia de inibir a angiogênese é uma estratégia há muito considerada na terapêutica anti-cancerígena, especialmente para os tumores altamente vascularizados, tal como o carcinoma hepatocelular. Sabe-se que a angiogênese é regulada por moléculas ativadoras como o VEGF ou o bFGF, e inibidoras, tal como a angiostatina ou a trombospondina-1. A utilização de supressores da angiogênese ou de antagonistas de recetores específicos pode inibir a neovascularização e, conseqüentemente, o crescimento tumoral, tal como ilustrado na figura 1.6. Infelizmente, até agora, as terapias anti-angiogénicas não têm provado ser úteis em termos de sobrevivência a longo prazo (Nishida et al. 2006; Zetter 2008). No entanto, devido ao reconhecido potencial deste tipo de abordagem, as terapias anti-angiogénicas continuam a ser intensamente exploradas.

Uma vez que a membrana amniótica humana expressa diversos fatores anti-angiogénicos, Seo et al. propuseram em 2008 que este tecido pudesse ser utilizado como terapia anti-cancerígena. Por outro lado, e atuando enquanto barreira física, espera-se que a membrana amniótica seja também capaz de inibir a disseminação de diversos mediadores angiogénicos (Seo et al. 2008; Mamede et al. 2012; Mamede et al. 2015).



**Figura 1.6** - Terapia anti-angiogénica. A utilização de terapias anti-angiogénicas, particularmente em tumores altamente vascularizados, pode inibir o aparecimento de novos vasos sanguíneos, contribuindo assim para a inibição tumoral. Adaptado de (Zetter 2008).

A inflamação crónica, induzida por diversos fatores biológicos, químicos ou físicos, tem sido desde há muito tempo associada ao desenvolvimento do cancro. Sabe-se que a inflamação modula a transformação celular, a sobrevivência, a proliferação, a invasão, a angiogénese e a metastização ao longo do processo carcinogénico (Reuter et al. 2010). Dados epidemiológicos indicam que existe uma forte relação entre a inflamação e a predisposição para o desenvolvimento do cancro (Rakoff-Nahoum 2006). Sabe-se também que a inflamação e o sistema imunitário podem inibir o desenvolvimento tumoral através de dois mecanismos diferentes. O primeiro mecanismo baseia-se na capacidade que o hospedeiro possui para identificar e eliminar células alteradas. Por outro lado, o reconhecimento por parte do sistema imunitário adaptativo de antígenos associados a tumores é também um mecanismo através do qual o sistema imunitário controla o desenvolvimento cancerígeno (Rakoff-Nahoum 2006; Coussens & Werb 2002; Balkwill & Mantovani 2016).

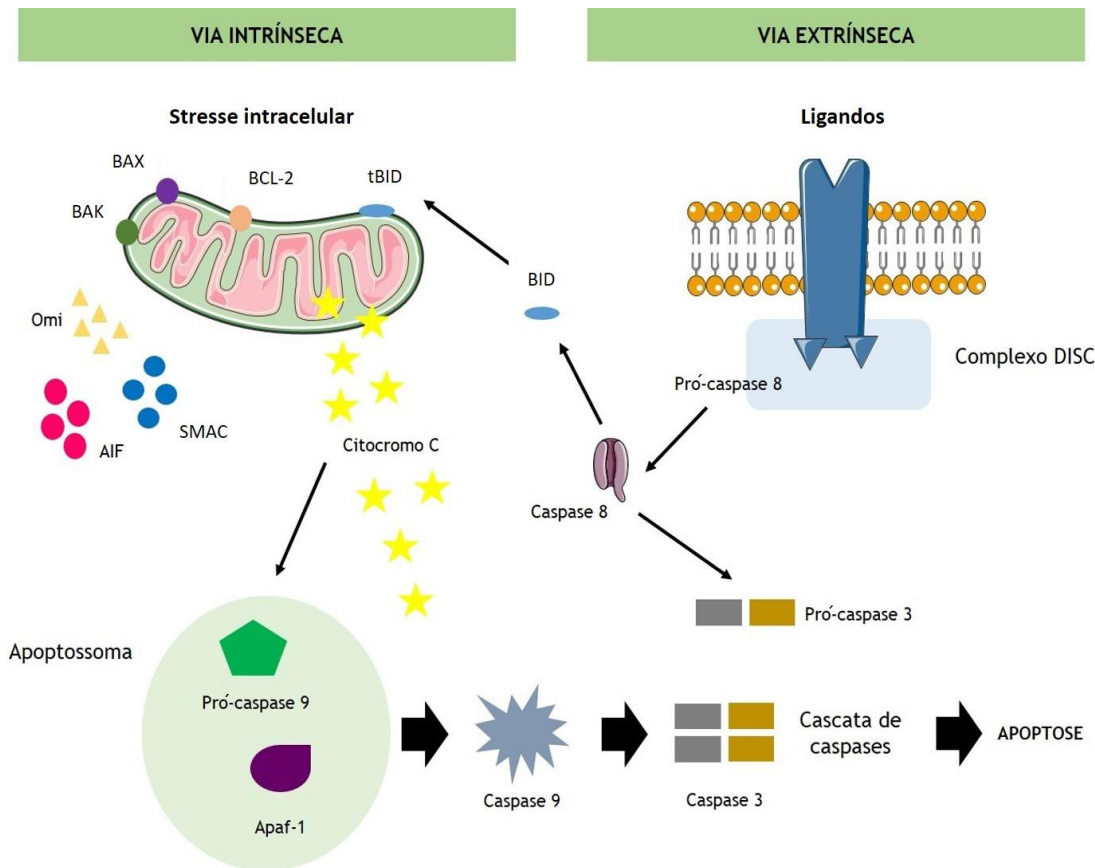
A correlação entre a inflamação e o cancro foi confirmada por efeito das terapias anti-inflamatórias, que revelaram ser altamente eficazes na prevenção e no tratamento do cancro (Reuter et al. 2010). Desta forma, e tendo em conta as propriedades anti-inflamatórias da membrana amniótica já documentadas, espera-se que este tecido consiga modular o microambiente inflamatório tumoral, exercendo assim uma atividade anti-cancerígena (Seo et al. 2008; Mamede et al. 2012; Mamede et al. 2015).

A resistência à morte celular é uma das características das células tumorais e um dos maiores obstáculos para a eficácia das terapias comumente utilizadas. Os tipos de morte celular podem ser qualificados de acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas.

A necrose é um tipo de morte celular em que ocorre o aumento do volume celular, a agregação da cromatina, a desorganização do citoplasma, a perda da integridade da membrana plasmática e a sua consequente rutura, induzido a libertação do conteúdo celular (Grivicich et al. 2007). Por outro lado, a apoptose é um tipo de morte celular altamente coordenado que envolve a ativação de caspases e uma complexa cascata de eventos (Elmore 2007). Durante a apoptose ocorre a retração celular e a picnose e os núcleos desintegram-se no interior da membrana nuclear. Na membrana celular formam-se prolongamentos (*blebs*) que originam os corpos apoptóticos, que são posteriormente fagocitados por macrófagos e removidos na ausência de processo inflamatório (Grivicich et al. 2007; Elmore 2007; Edinger & Thompson 2004).

Existem diversos fatores que podem desencadear a apoptose, podendo esta ser iniciada através de duas vias, a via extrínseca ou a via intrínseca. A via extrínseca, representada na figura 1.7, envolve interações mediadas por recetores transmembranares. Estes recetores pertencem à superfamília de recetores do fator de necrose tumoral (TNFR, do inglês *tumor necrosis factor receptors*), que inclui o ligando e o recetor Fas e o TNF- $\alpha$ /TNFR1. Estes recetores possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, que possibilita o reconhecimento dos ligandos. Após a conexão do ligando ao seu recetor, a cascata de caspases pode ser ativada devido à porção citoplasmática dos recetores, denominada por

"domínio de morte". Este domínio de morte desempenha um importante papel na transmissão do sinal de morte da superfície celular para as vias de sinalização intracelulares.



**Figura 1.7** - Via apoptótica intrínseca e extrínseca. Na via intrínseca, ocorre a libertação do citocromo C da mitocôndria, o que resulta na formação do apoptossoma e na ativação da caspase 9. Na via extrínseca, após a ligação de ligandos específicos aos receptores, forma-se o complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*) e a caspase 8 é ativada. A caspase 8 e a caspase 9 ativam outras caspases, tal como a caspase 3, induzindo a morte celular por apoptose. As duas vias apoptóticas estão relacionadas através da proteína agonista da morte com domínio de interação BH3 (BID, do inglês *BH3 interacting domain death agonist*). Adaptado de (Favaloro et al. 2012) e de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Quando os recetores de morte celular reconhecem um ligando específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas, como a proteína associada ao Fas com domínio de morte (FADD, do inglês *Fas-associated death domain*). Tais moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase 8 que ativa, por sua vez, a caspase 3, concretizando a morte celular por apoptose (Grivicich et al. 2007; Elmore 2007).

A via intrínseca, também ilustrada na figura 1.7, é ativada após a mitocôndria integrar os estímulos de morte celular, resultando no colapso do potencial da membrana mitocondrial (PMM) interna, bem como na transição da permeabilidade mitocondrial. Estes dois factos induzem a perda da homeostasia celular, interrompem a síntese de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) e aumentam a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) que, por sua vez, induzem a oxidação de lípidos,

proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do PMM e a ativação da caspase 9 e 3. Após a ruptura da mitocôndria, dá-se a consequente libertação de dois grupos de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (Edinger & Thompson 2004; Elmore 2007). O primeiro grupo de proteínas consiste no citocromo C, no SMAC (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspases*) e na protease HtrA2/Omi. O SMAC e a protease HtrA2/Omi promovem a apoptose através da inibição da atividade das proteínas inibidoras da apoptose (Grivicich et al. 2007). No citosol, o citocromo C forma um complexo com o fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (Apaf-1, do inglês *apoptotic protease-activating factor 1*) e a caspase 9, formando o apoptossoma, que promove a clivagem da pró-caspase 9 e induz a libertação da caspase correspondente. Por sua vez, a caspase 9 ativará a caspase 3, dando início ao processo apoptótico (Grivicich et al. 2007).

O segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas libertadas tardiamente para o citoplasma, após a ruptura da mitocôndria, são o fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis inducing factor*), a endonuclease G e a DNase ativada por caspase (CAD, do inglês *caspase-activated DNase*). A AIF transloca-se para o núcleo e causa a fragmentação do ADN, causando a condensação da cromatina nuclear periférica. A endonuclease G também é translocada para o núcleo, onde cliva a cromatina nuclear e produz fragmentos oligonucleossomais do ADN. A CAD é subsequentemente libertada pela mitocôndria e, posteriormente à translocação para o núcleo, induz a fragmentação do ADN oligonucleossomal após a clivagem da caspase 3, potenciando a condensação da cromatina (Elmore 2007).

A família de proteínas BCL-2, reguladas pela proteína 53 (P53), tem um importante papel no controlo e na regulação da morte celular por apoptose. A família BCL-2 consiste num grupo de proteínas indutoras e repressoras da apoptose através da regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial. Até agora, foram identificados 25 genes na família BCL-2. Os membros da família BCL-2, como a BCL-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*), a BCL-XL (do inglês *B-cell lymphoma-extra large*) e a BCL-XS (do inglês *B-cell lymphoma-extra short*), inibem a apoptose, pois previnem a libertação de citocromo C (reguladores anti-apoptóticos). Por outro lado, a BCL-10 (do inglês *B-cell lymphoma/leukemia 10*), a BAX (do inglês *BCL-2 associated X protein*), a BID, a BAD (do inglês *BCL-2-associated death promoter*), a BIK (do inglês *BCL-2-interacting killer*) e a BLK (do inglês *B lymphocyte kinase*) são proteínas pró-apoptóticas. A homeostasia é mantida pelo controlo entre a expressão de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como os danos no ADN, podem induzir o aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas, instigando a apoptose (Elmore 2007; Brito 2014).

Entre as proteínas mais estudadas desta família estão a BAX (pro-apoptótica) e a BCL-2 (anti-apoptótica). Estas proteínas são capazes de formar homodímeros (BAX/BAX e BCL-2/BCL-2) e heterodímeros (BAX/BCL-2), e o equilíbrio entre os homodímeros e os heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula cancerígena. Após um estímulo de morte, a BCL-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, através do sequestro da BAX ou através da competição por locais que

poderiam ser ocupados por esta proteína na membrana externa mitocondrial. A BAX pode promover a apoptose através da relação com a mitocôndria de forma independente da interação com as proteínas anti-apoptóticas (Grivicich et al. 2007; Elmore 2007).

Vale a pena referir que muitas das alterações genéticas observadas no cancro induzem alterações na relação entre os membros pro-apoptóticos e anti-apoptóticos da família BCL-2. A proteína BCL-XL e a proteína da leucemia de células mieloides 1 (MCL-1, do inglês *myeloid cell leukemia 1*) estão sobre-expressas numa elevada percentagem de casos de cancro. Pelo contrário, as proteínas pro-apoptóticas BAX e BCL-XS possuem uma baixa expressão nos casos de cancro que possuem uma desregulação na via de sinalização da P53 (Fabregat 2009).

Tal como referido previamente, estudos recentes provaram que a membrana amniótica humana é capaz de induzir apoptose em diversos tipos de células, através de diversos mecanismos e vias de sinalização. Devido a esta característica, espera-se que a membrana amniótica seja capaz de diminuir a resistência à apoptose, influenciando assim a agressividade tumoral e a resposta à terapêutica ou até de induzir, por si só, a apoptose celular (Seo et al. 2008; Mamede et al. 2012; Mamede et al. 2015).

## 1.2.2 Evidências

Na última década surgiu a ideia de utilizar a membrana amniótica humana como terapia anti-cancerígena. Desde então, a publicação de artigos científicos sobre este tema tem vindo a aumentar, existindo atualmente resultados obtidos através de modelos *in vitro* e *in vivo* que sugerem que a membrana amniótica pode efetivamente ser útil na terapia do cancro. Infelizmente, os mecanismos através dos quais este tecido e os seus derivados, células e meio condicionado, atuam nas células cancerígenas não se encontram ainda esclarecidos.

Desta forma, apesar da ideia da membrana amniótica humana poder vir a ser útil no tratamento oncológico ter sido apresentada em 2008 por Seo e a sua equipa (Seo et al. 2008), apenas em 2012 surgiram os primeiros resultados experimentais que viriam a suportar esta hipótese.

Kang et al. estudaram o efeito das hAECs no cancro da mama em modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando para tal a linha celular MDA-MB-231. Os autores concluíram, através de co-culturas, que as hAECs exercem um efeito anti-proliferativo no cancro da mama. Contrariamente, as hAECs foram incapazes de alterar a proliferação de fibroblastos bovinos. Foi também verificado o efeito anti-cancerígeno das hAECs *in vivo*, uma vez que injeções peritumorais de hAECs em xenotransplantes de cancro da mama resultaram na inibição do crescimento tumoral e no aumento da sobrevivência dos animais. Curiosamente, os resultados obtidos nos ratinhos não revelaram ser dependentes do número de células inoculadas. Os autores deste trabalho verificaram também que, após administração, as hAECs se localizam

no interior do tecido tumoral. Adicionalmente, estes autores verificaram que a combinação das hAECs com o 5-fluorouracilo (5-FU) era sinérgica (Kang et al. 2012).

Os resultados obtidos por Kang e colaboradores (Kang, Yi, et al. 2012) reforçam o facto de muitos autores acreditarem que, para além das propriedades anti-angiogénicas, anti-inflamatórias e pro-apoptóticas da membrana amniótica humana, os bons resultados obtidos se devem às propriedades estaminais das hAECs e das hAMCs. Sabe-se que, quando administradas por via sistémica, as células estaminais possuem a capacidade de migrar até ao tumor. Apesar deste mecanismo ainda não ser totalmente entendido, a teoria mais aceite é a de que o tumor expressa recetores específicos, ou ligandos, que permitem a adesão das células estaminais ao tumor devido aos agentes quimiotáticos por si libertados. Desta forma, as células estaminais podem alojar-se no tumor, modulando o microambiente circundante e exercendo o seu efeito anti-cancerígeno (Belmar-Lopez et al. 2013; Mamede et al. 2015; Kang, Yi, et al. 2012).

Niknejad e os seus colegas verificaram que o meio condicionado obtido da cultura da membrana amniótica humana, bem como o meio condicionado obtido da cultura das hAECs, era capaz de diminuir a viabilidade *in vitro* de células de cancro cervical (linha celular HeLa) e de cancro da mama (linha celular MDA-MB-231) de forma dependente do volume do meio condicionado utilizado. Este efeito foi acompanhado pelo aumento da apoptose mediada pela caspase 3 e pela caspase 8, bem como pela degradação celular e pela redução da motilidade das células cancerígenas. Tendo em conta os resultados similares obtidos para o meio condicionado pela membrana amniótica humana e o meio condicionado pelas hAECs, os autores sugeriram que estas células fossem as verdadeiras responsáveis pelos efeitos anti-cancerígenos da membrana amniótica humana. Desta forma, e através do ensaio do anel aórtico, os autores verificaram posteriormente que na presença de hAECs não se formavam novos capilares, ao contrário do que acontecia na presença das hAMCs (Niknejad & Yazdanpanah 2014; Niknejad et al. 2014).

Relativamente ao efeito anti-cancerígeno das hAMCs, Jiao et al. avaliaram o efeito terapêutico das hAMCs no crescimento de glioma, através de modelos experimentais obtidos com recurso à linha celular C6. Após isolamento das hAMCs, os autores verificaram que a administração intra-tumoral única de hAMCs em xenotransplantes de glioma reduzia significativamente o volume tumoral, tal como documentado na figura 1.8, sendo este efeito potenciado no caso de administrações múltiplas de hAMCs. As hAMCs induziram apoptose nas células de glioma, tendo sido verificado um aumento na expressão de BAX e um decréscimo na expressão de BCL-2 nas células tumorais. Verificou-se também o aumento da expressão da caspase 8 e da caspase 3 após o tratamento (Jiao et al. 2012).

O efeito anti-cancerígeno das hAMCs foi também avaliado através de modelos *in vitro* em diferentes linhas celulares cancerígenas de origem hematopoiética e não hematopoiética. Magatti e a sua equipa demonstraram que as hAMCs são capazes de inibir a proliferação tumoral através do contacto direto e indireto com as células cancerígenas, revelando a importância dos fatores inibitórios solúveis secretados pelas hAMCs. Neste estudo, as hAMCs

foram incapazes de induzir apoptose nas linhas celulares cancerígenas. No entanto, diminuíram a proliferação celular de forma dependente da concentração e induziram o bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1. Na presença das hAMCs, várias ciclinas (D2, E1 e H) e cinases dependentes de ciclinas (CDK2, CDK4 e CDK6) foram reguladas negativamente. Contrariamente, vários inibidores do ciclo celular, como a proteína 15 (P15) e a proteína 21 (P21) foram regulados positivamente (Magatti et al. 2012).



**Figura 1.8** - A administração intra-tumoral de hAMCs inibe o crescimento de gliomas, obtidos através da inoculação heterotópica das células C6 em ratinhos atímicos. Os animais receberam tratamento com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs, do inglês *human umbilical vein endothelial cells*) [grupo controlo - esquerda], ou uma suspensão com  $2 \times 10^6$  de hAMCs por via intratumoral ao terceiro dia de terapia [grupo terapia - direita]. Fotos alusivas ao dia 30 após início da terapia. Retirado de (Jiao et al. 2012).

Também o meio condicionado pelas hAMCs parece possuir efeito anti-cancerígeno, tal como sugerido no estudo previamente referido de Magatti e seus colaboradores (Magatti et al. 2012). Rolfo e a sua equipa verificaram que, após o tratamento de células do cancro da próstata LNCaP e PC3 com o meio condicionado pelas hAMCs, a proliferação diminuiu e o ciclo celular foi bloqueado nas fases G0/G1, tendo o número de células nas fases S e G2/M diminuído (Rolfo et al. 2014).

Contrariamente aos resultados referidos anteriormente, Kim et al. verificaram que as hAMCs, em co-cultura com células do cancro da mama (MCF-7 e MDA-MB-231), estimulavam a proliferação e a migração das células tumorais, sendo este o único estudo conhecido até agora que não suporta a ideia da utilização da membrana amniótica na terapêutica anti-cancerígena (Kim et al. 2015).

Nos seus trabalhos, Niknejad e a sua equipa têm defendido que a indução da apoptose nas células cancerígenas tem origem nas hAECs e que o atraso do ciclo celular se deve às hAMCs (Niknejad et al. 2013). Por outro lado, estes autores acreditam que a indução da apoptose, a inibição da angiogénese e o atraso no ciclo celular nas células tumorais após o tratamento com a membrana amniótica ou com as células suas derivadas, se deve à inibição

da proteína de choque térmico 90 (HSP90, do inglês *heat shock protein 90*). A HSP90 é um chaperone molecular dependente de ATP, necessária para a função de algumas proteínas promotoras tumorais, como a CDK2, 4 e 6. Desta forma, os inibidores da HSP90 podem constituir uma nova e dirigida terapia para o cancro (Niknejad et al. 2013).

Os resultados obtidos no âmbito desta tese, que serão revelados e discutidos ao longo dos próximos capítulos, indicam que a membrana amniótica humana possui efeito anti-cancerígeno quando utilizada como terapia no carcinoma hepatocelular.

## 1.3 Carcinoma hepatocelular

### 1.3.1 Epidemiologia

O carcinoma hepatocelular humano é a neoplasia do fígado mais frequente, retratando atualmente cerca de 70 a 90% dos tumores hepáticos primários (Marra et al. 2011; Gomes et al. 2013; Schütte et al. 2009).

O carcinoma hepatocelular representa um importante problema de saúde pública, sendo o sexto tipo de cancro mais incidente e a segunda causa de morte por cancro em todo o mundo (Siegel et al. 2016). Estudos epidemiológicos revelam que a taxa de incidência e a taxa de mortalidade atribuídas a este tipo de cancro são relativamente similares pois a maioria dos casos de carcinoma hepatocelular são detetados num estadio avançado, motivo que qualifica o carcinoma hepatocelular como um cancro altamente mortal (Yang & Roberts 2010). Em Portugal, a incidência e a mortalidade associada ao carcinoma hepatocelular são baixas representando, respetivamente, 2% e 3% de todos os tipos de cancro diagnosticados no país (Ferlay, Soerjomataram, et al. 2013).

Sabe-se que a incidência do carcinoma hepatocelular varia de acordo com o género. Dados estatísticos revelam que o carcinoma hepatocelular é o quinto tipo de cancro mais incidente e o segundo tipo de cancro mais mortal no género masculino. No caso do género feminino, o carcinoma hepatocelular é o nono tipo de cancro mais incidente e o sexto tipo de cancro mais mortal (Ferlay, Soerjomataram, et al. 2013). A razão entre a incidência do carcinoma hepatocelular nos homens e nas mulheres é de 2,4, sendo esta razão superior nas áreas onde se verifica elevada incidência da neoplasia (Chuang et al. 2009).

A maior incidência do carcinoma hepatocelular no género masculino pode ser explicada por várias razões. Por exemplo, os homens estão mais expostos a infeções pelo vírus da hepatite B (VHB) e pelo vírus da hepatite C (VHC), bem como a carcinogénios hepáticos, como o tabaco e o álcool (Yang & Roberts 2010). Adicionalmente, sabe-se também que a testosterona, através do recetor de androgénio, promove a proliferação das células hepáticas. Pelo contrário, os estrogénios podem suprimir a inflamação mediada pela IL-6, o que reduz o dano hepático e a proliferação celular no género feminino (Yang & Roberts 2010).

Para além da incidência do carcinoma hepatocelular variar de acordo com o género, também a idade condiciona a ocorrência deste tipo de cancro. Exceto em regiões onde a infeção pelo VHB é hiperendémica, o carcinoma hepatocelular raramente surge antes dos 40 anos de idade. Sabe-se que na Europa e na América do Norte o carcinoma hepatocelular é normalmente diagnosticado entre os 63 e os 65 anos de idade, enquanto na China o seu diagnóstico é frequentemente efetuado entre os 55 e os 59 anos (Brito 2014; Schütte et al. 2009).

A incidência do carcinoma hepatocelular varia também de acordo com a distribuição geográfica. Neste contexto, mais de 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento, localizados no Leste e no Sudeste da Ásia e na África subsaariana, fator largamente relacionado com a infeção pelo VHB. Contrariamente, a incidência do carcinoma hepatocelular é muito mais baixa nas regiões desenvolvidas como a América, a Europa, a Austrália e a Nova Zelândia (Yang & Roberts 2010; El-Serag 2012).

De referir que a incidência do carcinoma hepatocelular tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos nos países mediterrânico, nos Estados Unidos da América e no Canadá (Marra et al. 2011). Contrariamente, a incidência deste tipo de cancro está a diminuir em países como a China e o Japão (El-Serag 2012). Pensa-se que o aumento da incidência do carcinoma hepatocelular nos países ocidentais pode estar maioritariamente relacionado com a infeção pelo VHC o que, por sua vez, pode ser uma consequência da emigração proveniente de áreas onde a infeção pelo VHB é endémica (Yang & Roberts 2010; El-Serag 2012). Contrariamente, pensa-se que a diminuição da incidência em países como a China e o Japão se deve, principalmente, ao estabelecimento de medidas que visam o aumento da qualidade da saúde pública (Carr 2010).

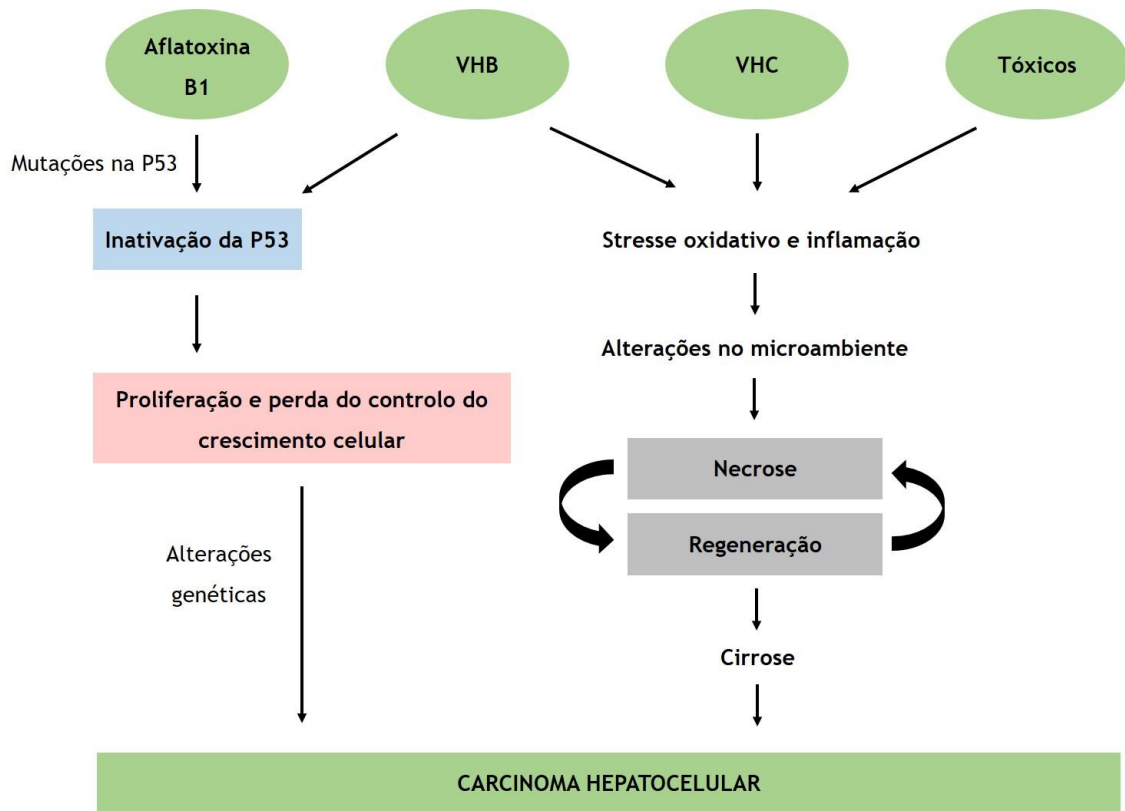
A etnia é outro fator associado ao carcinoma hepatocelular, pois sabe-se que existe uma baixa incidência entre indivíduos de etnia caucasiana relativamente a indivíduos de origem afro-americana. Por outro lado, a incidência do carcinoma hepatocelular é mais baixa nas populações afro-americanas do que nas populações de origem asiática, nas ilhas do pacífico ou nos americanos nativos (El-Serag 2012).

### **1.3.2 Etiologia**

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular são a infeção pelo VHB e pelo VHC, bem como o consumo de álcool. Estes fatores, entre outros explicitados na figura 1.9, determinam largamente o ambiente inflamatório e oxidativo em que este tipo de cancro se desenvolve (Reuter et al. 2010; Takaki & Yamamoto 2015; Urtasun et al. 2015; Klaunig et al. 2010).

Cerca de 50 a 55% de todos os casos de carcinoma hepatocelular são atribuídos à infeção viral persistente com o VHB (Schütte et al. 2009). O VHB pode codificar proteínas virais oncogénicas que podem, por sua vez, contribuir para a hepatocarcinogénese através da

desregulação de diversas vias de sinalização responsáveis pela transcrição gênica, pela resposta celular ao stresse genotóxico, pelo ciclo celular, pela reparação do ADN, pela resposta imunitária, pela degradação proteica e pela apoptose (Mazzanti et al. 2008; Goma et al. 2008; Chen & Wang 2015).



**Figura 1.9** - Fatores de risco para o carcinoma hepatocelular. Para além dos fatores de risco evidenciados na figura, vale a pena referir que o VHB e a aflatoxina B1 são capazes de afetar o genoma, pois o VHB pode integrar-se no genoma do hospedeiro e a aflatoxina B1 é mutagénica. Adaptado de (Farazi & DePinho 2006).

Foram já identificados vários fatores preditivos do carcinoma hepatocelular relacionados com o VHB, tais como a viremia elevada (Chen et al. 2006) ou o genótipo C (Yu et al. 2005; Yang et al. 2002). Os portadores do VHB possuem um risco 100 vezes maior de desenvolver carcinoma hepatocelular relativamente a pessoas não infetadas, podendo este risco aumentar para 1000 vezes se a infeção viral ocorrer num fígado cirrótico (Teufel et al. 2009).

Existem atualmente cerca de 400 milhões de pessoas infetadas pelo VHB, com um predomínio na Ásia e na África. Confirma-se uma forte correlação geográfica entre a incidência do carcinoma hepatocelular e a prevalência da infeção pelo VHB. Por outro lado, a variabilidade geográfica da incidência do carcinoma hepatocelular e a variação da incidência do VHB entre diferentes grupos etários reflete também a epidemiologia e a história natural da infeção pelo VHB. Em regiões desenvolvidas e de baixo risco de incidência do carcinoma hepatocelular, a infeção pelo VHB ocorre maioritariamente durante a adolescência e a idade

adulta através de comportamentos de risco, tais como o contacto sexual ou a partilha de agulhas. Nestas regiões, a infeção pelo VHB pode também ocorrer por causas iatrogénicas, que incluem as transfusões de sangue, os procedimentos invasivos, como a hemodiálise ou o transplante de órgãos (Bosch et al. 2004; Yang & Roberts 2010). Por outro lado, em regiões de elevado risco, como a Ásia e a África, a forma predominante de transmissão do VHB é a transmissão da gestante para o embrião/feto (El-Serag 2012).

A aflatoxina B1 é uma micotoxina produzida por fungos (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*), sendo comum em regiões onde o clima e o armazenamento deficiente favorecem o seu desenvolvimento, como a Ásia e algumas regiões da África. Nestas regiões, a aflatoxina B1 é um contaminante comum de sementes, como o milho ou o arroz, e de especiarias, como a pimenta ou o amendoim.

A aflatoxina B1 provoca uma mutação na terceira base do codão 249 do gene codificante da P53, o que induz a atenuação da sua função supressora tumoral além de promover a instabilidade genómica. Esta mutação foi detetada em 30 a 60% dos casos de carcinoma hepatocelular em áreas endémicas de aflatoxina B1. Apesar de a aflatoxina B1 poder contribuir para a hepatocarcinogénese através de outros mecanismos, o seu papel na patogénese do carcinoma hepatocelular é primeiramente mediado através dos efeitos sinérgicos com o VHB (El-Serag 2012; Gomes et al. 2013; Mazzanti et al. 2008; Chuang et al. 2009).

Outra causa de carcinoma hepatocelular é a infeção pelo VHC. Estima-se que esta infeção seja responsável por cerca de 31% dos casos de carcinoma hepatocelular (El-Serag 2012). Pensa-se que o aumento dos casos de VHC está relacionado com a utilização de sangue contaminado e com a utilização de agulhas infetadas, relacionadas com a prática da tatuagem ou com a utilização de drogas intravenosas (Schütte et al. 2009).

Existe uma grande variação geográfica na incidência do VHC, sendo as regiões de maior prevalência os países de leste, região mediterrânica, Japão, América latina e certas regiões da África e da Europa Ocidental. A incidência do carcinoma hepatocelular na população infetada por VHC pode variar de acordo com a existência de vários fatores, como a existência de cirrose hepática (Fattovich & Llovet 2006). Também em relação ao consumo de álcool (>50g/dia), o género masculino e a idade avançada podem aumentar o risco de incidência do carcinoma hepatocelular em portadores do VHC, bem como a coinfeção com o VHB ou com o VIH (Fattovich & Llovet 2006; Urtasun et al. 2015; El-Serag 2012).

Até agora, os mecanismos através dos quais o VHC induz o aparecimento do carcinoma hepatocelular não foram descobertos. Pensa-se que, no contexto da infeção pelo VHC, a inflamação crónica possa induzir fibrose e que, conseqüentemente, esta possa progredir para a cirrose hepática, representando esta um importante fator de risco para o desenvolvimento da hepatocarcinogénese (Gomaa et al. 2008; Schütte et al. 2009). Pensa-se também que os mecanismos específicos da infeção viral possam ser responsáveis pela transformação maligna dos hepatócitos, em parte devido à produção de ROS (Schütte et al. 2009; El-Serag 2012; Gomaa et al. 2008).

O elevado consumo de álcool nos países industrializados é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da cirrose hepática e, conseqüentemente, do carcinoma hepatocelular. Sabe-se que a ingestão crônica de álcool (>50g/dia) se correlaciona com o aumento da incidência do carcinoma hepatocelular, uma vez que o álcool pode induzir cirrose, atuar como carcinogênico ou atuar de forma sinérgica com outros fatores de risco, como o VHB, o VHC, a aflatoxina B1 ou o tabagismo (Schütte et al. 2009; El-Serag 2012).

A inflamação crônica induzida pelo abuso do álcool induz uma estimulação da apoptose e, através do aumento da lesão celular, um aumento da proliferação celular, da regeneração hepática e do stresse oxidativo que, por sua vez, conduzem a danos no ADN. Este efeito é ainda potenciado pela presença de metabolitos tóxicos, como o acetaldeído proveniente na metabolização do álcool etílico, que é capaz de se ligar ao ADN e induzir alterações genômicas, inibindo as enzimas reparadoras do ADN. Este efeito é intensificado se existir um defeito genético na enzima metabolizadora, a álcool desidrogenase (Schütte et al. 2009). Elevadas concentrações de acetaldeído conduzem a uma diminuição da resposta antioxidante, através da ligação da glutatona (GSH) e da redução da GSH mitocondrial. Tais eventos induzem à disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e diminuição da tolerância celular ao TNF- $\alpha$  (Schütte et al. 2009).

O abuso crônico de álcool induz também o aumento da expressão do citocromo P450 oxidase 2E1, conhecido por CYP2E1, através do qual se produzem as ROS. Todos estes efeitos podem ser potenciados se coexistir deficiência alimentar de vitaminas e outros micronutrientes, como o ácido fólico ou o retinol (Schütte et al. 2009; Chuang et al. 2009; El-Serag 2012).

Sabe-se atualmente que o tabagismo se correlaciona positivamente com o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Esta correlação é particularmente forte no caso de doentes portadores de cirrose hepática e de infeção crônica com o VHB ou com o VHC (Simão 2014; Chuang et al. 2009; El-Serag 2012).

Outros fatores clínicos, como a obesidade, a diabetes, a resistência à insulina, a esteatose hepática não-alcoólica, assim como diversos fatores alimentares, podem conduzir à formação de um fígado cirrótico induzindo, em último caso, o aparecimento do carcinoma hepatocelular (El-Serag 2012; Chuang et al. 2009; Blonski et al. 2010). Para além destes fatores, sabe-se ainda que existem algumas doenças metabólicas e genéticas, tais como a hepatite autoimune, a hemacromatose, a deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina, a doença de Wilson e a porfíria, que constituem importantes fatores de co-morbilidade para o carcinoma hepatocelular (Schütte et al. 2009; Chuang et al. 2009; El-Serag 2012; Gomaa et al. 2008).

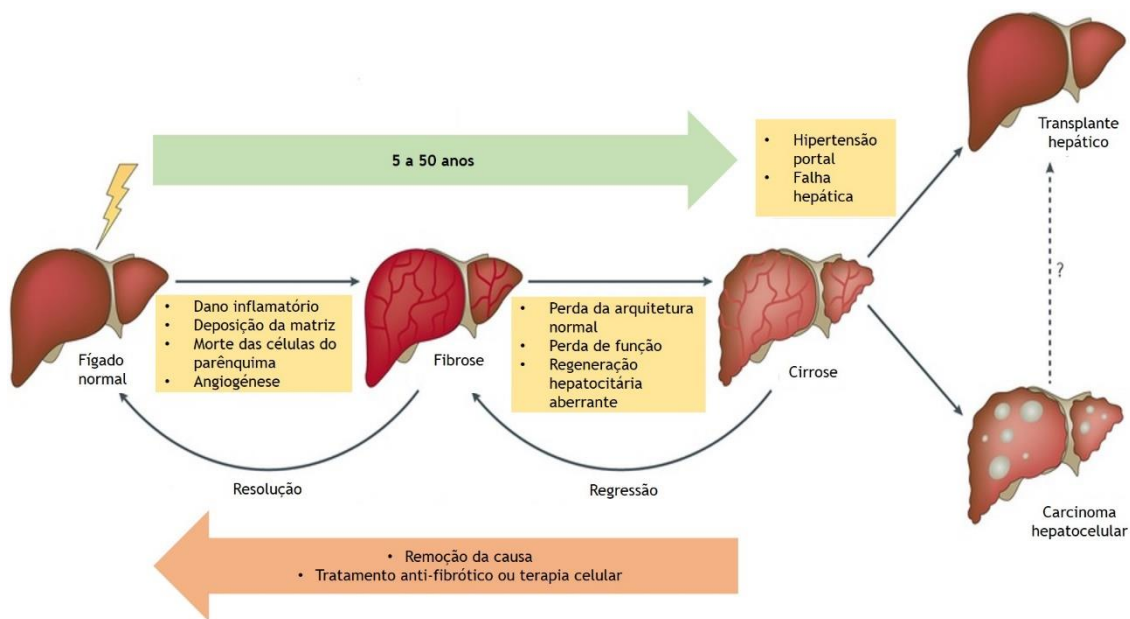
### **1.3.3 Patofisiologia**

A patofisiologia do carcinoma hepatocelular é multifatorial e ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que os eventos que medeiam o aparecimento do fígado cirrótico

contribuem largamente para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, uma vez que a cirrose é encontrada em cerca de 80% a 90% dos doentes com carcinoma hepatocelular (Alves et al. 2011; Marra et al. 2011).

Após lesão hepática, a morte dos hepatócitos induz a mobilização das plaquetas, de linfócitos e de macrófagos, incluindo as células de Kupffer. Este ambiente inflamatório, altamente rico em TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  e PDGF, ativa as células hepáticas estreladas (Tsukada et al. 2006). Estas células, também ativadas pelo elevado stresse oxidativo, são convertidas em células altamente proliferativas, pro-inflamatórias e fibrinogénicas, capazes de produzir uma grande quantidade de proteínas da matriz extracelular (Krizhanovsky et al. 2008; Pinzani & Rombouts 2004).

Quando ocorre uma exposição prolongada a fatores capazes de induzir lesão, o dano induzido estimula a constante regeneração hepática (Tralhão et al. 2013). Como consequência, as proteínas da matriz extracelular acumulam-se no tecido hepático, tal como ilustrado na figura 1.10 (Pinzani & Rombouts 2004).

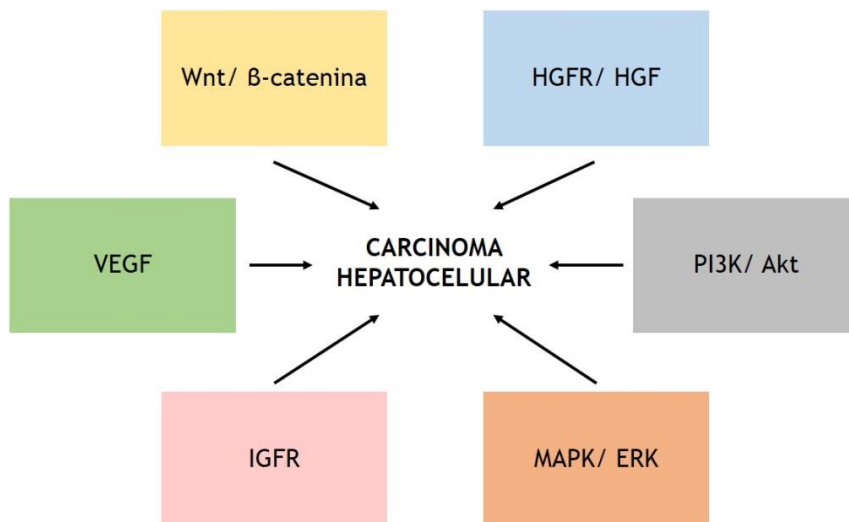


**Figura 1.10** - Hepatocarcinogénese. A fibrose hepática é a resposta do fígado aos danos crónicos induzidos por fatores como a infeção viral, o álcool ou a esteatose hepática não-alcoólica. Como resultado, aumenta a inflamação, a deposição de proteínas da matriz extracelular, a morte de células do parênquima hepático e a angiogénese. Poderá ocorrer a consequente disrupção da arquitetura hepática, a perda de função do órgão e a regeneração hepatocitária aberrante, estimulando assim a ocorrência da cirrose. Sabe-se que a cirrose é um fator de risco para o carcinoma hepatocelular. Adaptado de (Pellicoro et al. 2014).

A remodelação da matriz extracelular é assegurada pelas MMP, enzimas que são produzidas pelas células hepáticas estreladas e pelas células de Kupffer (Brandão et al. 2006; Qin & Han 2010; Han 2006). Estas enzimas e os seus inibidores, as TIMP, asseguram o normal metabolismo e a estrutura da matriz extracelular. No processo fibrótico, e devido à desregulação da relação entre as MMP e as TIMP, forma-se uma cicatriz fibrosa (Friedman

2008; Bataller & Brenner 2005). Se ocorrer a substituição progressiva do parênquima hepático, pode desenvolver-se cirrose, uma doença hepática caracterizada pela presença de nódulos regenerativos rodeados por fibrose e pela disrupção permanente da estrutura hepática. Tal pode resultar na severa perda de funções hepáticas e no consequente aparecimento do carcinoma hepatocelular (Zhou et al. 2014; Schuppan & Afdhal 2008; Malhi et al. 2010; Thorgeirsson & Grisham 2002; Gomes et al. 2013).

Durante o processo de hepatocarcinogénese ocorrem alterações em inúmeras vias de sinalização, tal como referido na figura 1.11, das quais se destacam a via de sinalização do VEGF, a via de sinalização das proteínas-quinases ativadas por mitógenos/cinases reguladas por sinais extracelulares (MAPK/ERK, do inglês *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*), a desregulação do HGFR e do seu ligando HGF, a via de sinalização do recetor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR, do inglês *insulin-like growth factor receptor*), a via de sinalização fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt, do inglês *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*) e a via de sinalização Wnt/B-Catenina (Bruix et al. 2004; Bruix & Sherman 2011).



**Figura 1.11** - Principais vias de sinalização alteradas durante o processo de hepatocarcinogénese. Propriedade da autora.

A via de sinalização do VEGF possui um importante papel na regulação da angiogénese. Por outro lado, a via de sinalização das MAPK/ERK, cuja ativação resulta da regulação positiva pela ativação do EGF, do IGF, do recetor do fator de crescimento hepatocitário (HGFR, do inglês *hepatocyte growth factor receptor*) e pelo silenciamento epigenético de genes supressores tumorais, como o NORE1A, tem como função regular múltiplas funções celulares como o crescimento, a sobrevivência e a diferenciação. A desregulação do HGFR e do seu ligando, o HGF, implica inúmeras consequências ao nível da regeneração celular após o dano hepático, tal como a desregulação da via de sinalização do IGFR, ativa em 20% dos casos de carcinoma hepatocelular. A via de sinalização PI3K/Akt é responsável pelo controlo do

crescimento, sobrevivência, metabolismo e apoptose celular. A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina encontra-se frequentemente alterada no carcinoma hepatocelular, sendo que a sua ativação ocorre como resultado de mutações na  $\beta$ -catenina, a sobre-expressão de recetores Frizzled ou a inativação da E-caderina (Bruix et al. 2015; Chen & Wang 2015). De referir ainda que existem outras vias de sinalização que estão igualmente implicadas na hepatocarcinogénese, tal como a via Hedgehog, fundamental no desenvolvimento humano, ou a via Notch, responsável pelo desenvolvimento de células embrionárias (Bruix et al. 2015).

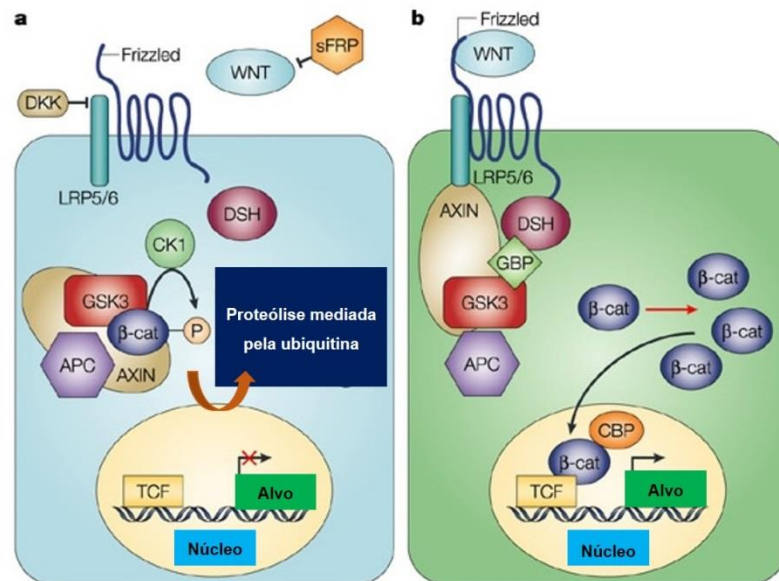
Alterações genéticas nos hepatócitos maduros durante a carcinogénese do fígado induzem, entre outras modificações, a proliferação e a resistência à morte celular. Desta forma, as células do carcinoma hepatocelular são caracterizadas por uma considerável perda de heterozigotia, que contempla múltiplos cromossomas, bem como mutações em diversos genes, incluindo os genes da  $\beta$ -catenina, da P53, da proteína 73 (P73), da proteína do retinoblastoma (Rb), da proteína da polipose adenomatosa coli (APC, do inglês *adenomatous polyposis coli*), da proteína DLC-1 (do inglês *deleted in liver cancer 1*), da proteína 16 (P16), da proteína homóloga da fosfatase e da tensina (PTEN, do inglês *phosphatase and tensin homolog protein*), do IGF-1, da proteína do cancro da mama 1 (BRCA1, do inglês *breast cancer 1*), da proteína supressora da sinalização de citocinas 1 (SOCS-1, do inglês *suppressor of cytokine signaling 1*), da proteína SMAD (do inglês *small mothers against decapentaplegic*) do tipo 2 e 4, do c-Myc e da ciclina D1 (Alves et al. 2011; Brito 2014).

A mutação no gene da  $\beta$ -catenina assume especial importância no contexto do carcinoma hepatocelular, desempenhando esta proteína um importante papel na adesão celular quando localizada na membrana citoplasmática, através da ligação à E-caderina. Quando se encontra livre no citoplasma, esta proteína é responsável pela via de sinalização canónica do Wnt, exposta na figura 1.12 (Behari 2010; Moon et al. 2004; Nejak-bowen & Monga 2011).

A  $\beta$ -catenina desempenha também um importante papel como mediadora da sinalização das tirosinas cinases (Nejak-bowen & Monga 2011). Inúmeros estudos revelaram várias ligações entre a  $\beta$ -catenina mutada e outros oncogenes ou genes supressores tumorais, como o HGFR, que está envolvido na tumorigénese no fígado (Wang et al. 2015; Behari 2010).

De entre os genes mutados, assume especial importância o gene *TP53*, uma vez que as mutações neste gene contribuem para alterações significativas na expressão da proteína P53 (Ferreira et al. 1999; Lane et al. 2010). Mutações no gene *TP53* são frequentes no carcinoma hepatocelular e conduzem a alterações nos fatores que medeiam o crescimento, a sobrevivência, a progressão do ciclo celular, a reparação de danos no ADN, a resposta ao stress celular, a inibição da angiogénese e a morte celular (Ferreira et al. 1999; Lane et al. 2010; Wang & Sun 2010). Uma vez que estas funções são essenciais para a homeostasia celular, as alterações no gene da P53 têm um papel crucial no processo de carcinogénese. Vale a pena referir que as alterações no gene *TP53* condicionam também o prognóstico e a resposta à terapia de uma variedade de tumores (Ferreira et al. 1999). Sabe-se que, de forma

geral, os tumores com baixa expressão ou expressão mutada da P53 são geralmente resistentes à terapia (Brito 2014; Brito et al. 2012).



**Figura 1.12** - Via de sinalização canônica do Wnt. Se a via não for ativada (a), a β-catenina é degradada e os seus genes alvo não são ativados. Por outro lado, se a via de sinalização do Wnt estiver ativa (b), a degradação da β-catenina é reduzida, e esta proteína acumula-se no citoplasma e desloca-se posteriormente para o núcleo. No núcleo, liga-se ao fator celular T/fator intensificador linfóide (TCF/LEF, do inglês *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding*) e ativa a transcrição de genes, como o c-Myc e a ciclina D1, que desempenham um importante papel na regulação do ciclo celular. Adaptado de (Moon et al. 2004).

Em condições normais, a P53 encontra-se presente nas células em baixas concentrações, podendo ser ativada a transcrição desta proteína em resposta a inúmeros estímulos, como a exposição a radiação ionizante ou ultravioleta, a hipoxia, a hipertermia ou os danos no ADN (Ferreira et al. 1999). Quando tal acontece, esta proteína pode estabilizar o genoma de forma direta ou indireta. De forma direta, a P53 induz a paragem do ciclo celular na fase G1, podendo esta paragem ser reversível, uma vez que a P53 é responsável por induzir a apoptose ou por reparar os danos celulares. Assim, o ciclo celular poderá ser posteriormente retomado.

Por outro lado, a proteína P53 pode indiretamente agir como um fator de transcrição de inúmeros genes, induzindo a expressão e/ou ativação de proteínas que desempenham inúmeras funções. Entre elas salienta-se a P21, responsável pela inibição da atuação das cinases dependentes de ciclinas (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinases*), essenciais para o normal funcionamento do ciclo celular, particularmente da transição da fase G1 para a fase S (Brito 2014; Ferreira et al. 1999; Fabregat 2009).

### 1.3.4 Tratamento

O carcinoma hepatocelular em estadio inicial é frequentemente assintomático, motivando o comum diagnóstico desta patologia em estadio avançado. Neste caso, o prognóstico é particularmente mau. No entanto, mesmo quando o diagnóstico do carcinoma hepatocelular é efetuado numa fase precoce da doença, em que podem ser utilizados tratamentos potencialmente curativos, a recidiva é frequente (Brito et al. 2012; Cervello et al. 2012). O tratamento do carcinoma hepatocelular torna-se particularmente difícil se coexistir outra patologia hepática, como a cirrose. Desta forma, a escolha terapêutica mais adequada para cada doente é sempre efetuada tendo em conta, entre outros fatores, o estadio tumoral, a função hepática e o estado geral do doente (Simão 2014; Wrzesinski et al. 2013).

Quando a deteção do carcinoma hepatocelular é efetuada num estadio inicial, o transplante hepático e a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial são as opções terapêuticas mais adequadas, apresentando os doentes a elas submetidas uma taxa de sobrevivência entre os 60% e os 80%, 5 anos após o tratamento (Simão 2014; Brito 2014).

Relativamente ao transplante hepático, este é efetuado com o objetivo de tratar simultaneamente o cancro e a doença associada. Esta opção curativa pode ser utilizada no caso de doentes com tumores pequenos, multinodulares (até 3 nódulos com até 3cm cada) ou tumores únicos (menores ou iguais a 5cm de diâmetro máximo) acompanhados por insuficiência hepática avançada (Simão 2014). Contudo, devido à falta de dadores disponíveis e às diminutas compatibilidades entre o dador e o doente, esta terapia pode apenas ser aplicada a 5% dos doentes. Após o transplante podem surgir complicações pós-operatórias, tal como a rejeição do órgão transplantado ou a reinfeção viral (Brito 2014; Tralhão et al. 2013; Fernandes et al. 2014).

No contexto do transplante hepático, vale a pena ainda referir o transplante hepático de dador vivo, que utiliza o lobo hepático direito de um dador saudável, e que atualmente representa menos de 5% dos transplantes hepáticos em adultos devido ao elevado risco de mortalidade e de morbilidade (Simão 2014; Yang & Roberts 2010).

No caso da ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial, esta é utilizada no caso de tumores localizados e nunca em doentes que apresentem doença hepática associada, podendo esta terapia ser apenas aplicada a um número reduzido de doentes (10% a 30%). Da ressecção não advêm, por norma, complicações graves, podendo ser realizada com resultados aceitáveis (30 a 60% de sobrevivência aos 5 anos e taxa de mortalidade cirúrgica inferior a 3%) (Wörns & Galle 2010; Bruix & Sherman 2011; Wrzesinski et al. 2013; Alves et al. 2011). Infelizmente, a recorrência tumoral surge em 50% a 80% dos doentes aos 5 anos, podendo esta ser constituída por metástases intra-hepáticas ou por novos tumores (Simão 2014; Alves et al. 2011).

No contexto do tratamento paliativo do carcinoma hepatocelular, a ablação percutânea do tumor é uma opção terapêutica para os doentes com tumor não ressecável que

apresentem co-morbilidades, disfunção hepática ou quando existem poucos recursos cirúrgicos. A ablação percutânea inclui uma variedade de técnicas cujo objetivo é destruir o tumor através da injeção direta de químicos (etanol absoluto, ácido acético ou agentes quimioterápicos) ou através da destruição física (ablação térmica por radiofrequência, por micro-ondas ou por laser ou, em alternativa, crioablação) (Mazzanti et al. 2008; Yang & Roberts 2010). Estas técnicas são relativamente baratas, exigem um curto período de hospitalização e raramente apresentam complicações. A eficácia da ablação percutânea é predominantemente determinada pelo tamanho do tumor, sendo de 90% a 100% para tumores inferiores a 2cm (taxa de sobrevivência dos doentes de 71% após 5 anos). Para os tumores entre 2cm e 3cm, a eficácia é de 70%, enquanto para os tumores entre 3cm e 5cm a eficácia diminui para 50% (Mazzanti et al. 2008; Simão 2014).

Ainda no contexto do tratamento paliativo do carcinoma hepatocelular, vale a pena mencionar a quimioembolização transarterial (TACE, do inglês *transarterial chemoembolization*), a embolização transarterial (TAE, do inglês *transarterial embolization*), a quimioterapia intra-arterial e a radioterapia (interna e externa). Destas opções terapêuticas, a TAE e a radioterapia interna revelaram atividade anticancerígena mas não ofereceram resultados satisfatórios em termos de sobrevivência. Por outro lado, a TACE com recurso à cisplatina ou à doxorubicina provou ser benéfica em termos de eficácia anti-tumoral e sobrevivência dos doentes. Esta técnica é realizada em doentes com carcinoma hepatocelular em estadio intermédio ou em tumores em estadio inicial para os quais não pode ser prescrita uma opção curativa. Pode também ser utilizada em doentes assintomáticos com tumores multinodulares sem invasão vascular ou expansão extra-hepática (Mazzanti et al. 2008; Simão 2014; Wörns & Galle 2010).

A radioterapia e a quimioterapia sistémica são frequentemente prescritas em fases avançadas da doença como tratamento paliativo a doentes não elegíveis para tratamento local, como é o caso dos doentes que possuem metastização à distância e/ou invasão macrovascular (Furuse 2008). O carcinoma hepatocelular é classificado como um tumor altamente quimiorresistente e radioresistente. Para além desta característica, o efeito da radioterapia é também limitado pela elevada sensibilidade do fígado cirrótico à radiação, uma realidade presente na maioria dos casos de carcinoma hepatocelular (Simão 2014). Apesar disto, e na ausência de outras opções terapêuticas mais adequadas, estas terapias são frequentemente prescritas com o objetivo de aliviar os sintomas associados à normal progressão da doença e assim melhorar a qualidade de vida do doente (Brito et al. 2012).

Vários estudos têm indicado a doxorubicina, uma antraciclina pertencente à classe dos antibióticos anti-tumorais, como a base da quimioterapia para o carcinoma hepatocelular. A cisplatina e/ou o 5-FU são também agentes largamente utilizados na quimioterapia combinada para o tratamento do carcinoma hepatocelular (Furuse 2008; Brito et al. 2012). Para além destes fármacos, a gemcitabina, o ectoposídeo, a mitoxantrona, o paclitaxel, o irinotecano, a oxaliplatina e a capecitabina têm sido utilizados na quimioterapia sistémica do

carcinoma hepatocelular, em monoterapia ou em terapia combinada, com resultados igualmente decepcionantes (Brito 2014; Wrzesinski et al. 2013).

A doxorubicina é um dos agentes anti-cancerígenos mais usados no tratamento do carcinoma hepatocelular. O seu anel aromático intercala-se entre dois pares de bases do ADN, alterando a sua estrutura e induzindo a inibição da sua síntese e replicação. Os mecanismos sugeridos para os seus efeitos citotóxicos incluem a inibição de enzimas, como a topoisomerase 2, interferindo assim no crescimento celular e potenciando a morte celular.

Por outro lado, a doxorubicina pode ser oxidada com formação de semiquinona, um metabolito instável que pode ser reconvertido num processo que permite a libertação de ROS que induzem, por sua vez, a peroxidação lipídica e danos nas membranas celulares, no ADN e nas proteínas. Como resultado, a morte celular por apoptose é induzida (Chan & Lung 2004; Gewirtz 1999; Lee et al. 2002; Thorn et al. 2012).

Infelizmente, a taxa de resposta à terapia com recurso à doxorubicina é inferior a 20%, tendo-se registado apenas uma taxa de resposta completa em apenas 5% dos casos (Johnson 2000). Tal pode dever-se à resistência celular a este fármaco, mediada por mecanismos que envolvem a sobre-expressão de proteínas de resistência multifármacos. Também a amplificação da topoisomerase 2 $\alpha$  parece estar correlacionada com os mecanismos de resistência celular à doxorubicina. A cardiotoxicidade, bem como o efeito da doxorubicina em tecidos como o cérebro, os rins ou o fígado, é outro fator que tem limitado a sua aplicabilidade clínica (Gewirtz 1999; Lee et al. 2002; Thorn et al. 2012).

A cisplatina é um fármaco largamente aplicado no tratamento de várias neoplasias, pois é capaz de promover a apoptose (Florea & Büsselberg 2011). A cisplatina possui um átomo de platina na sua estrutura e, tal como a doxorubicina e o 5-FU, atua a nível do ADN (Siddik 2003). Após entrar nas células por difusão ou transporte ativo, a cisplatina induz a produção de ROS que, por sua vez, interferem com as bases do ADN (preferencialmente a guanina), induzindo a formação de adutos de ADN que podem fomentar a morte celular (Siddik 2003).

Infelizmente, inúmeros estudos têm revelado vários mecanismos de resistência celular a este fármaco (Siddik 2003; Florea & Büsselberg 2011). Pensa-se que a diminuição da acumulação intracelular da cisplatina possa dever-se à ativação de mecanismos de reparação do ADN ou a mecanismos que induzam a inativação celular da cisplatina (Brito et al. 2012).

O 5-FU é um análogo da pirimidina e é largamente utilizado na quimioterapia convencional em diversos tipos de cancro. O seu mecanismo de ação baseia-se na incorporação de fluoronucleótidos no ácido ribonucleico (ARN) e no ADN, bem como na inibição da enzima timidilato sintetase, responsável pela síntese de nucleótidos. O 5-FU é considerado um antimetabolito, atuando como análogo do uracilo com um átomo de flúor. Sendo um análogo do uracilo, o 5-FU utiliza os mecanismos de transporte facilitado do uracilo, entrando rapidamente no interior da célula. Uma vez dentro da célula, o 5-FU é convertido em diferentes metabolitos que induzem a desregulação da síntese de ARN e de ADN, bem como a perturbação da ação da enzima timidilato sintetase (Longley et al. 2003; Johnson 2000; Giglia et al. 2010). Uma vez que a timidilato sintetase é responsável pela

formação de blocos de timidina-piridina, essenciais para a replicação de ADN, a administração de 5-FU leva a uma diminuição da replicação do ADN e, conseqüentemente, à morte celular (Longley et al. 2003; Giglia et al. 2010; Parker & Cheng 1990).

Como referido anteriormente, a quimioterapia convencional é geralmente ineficaz, uma vez que os fármacos quimioterápicos induzem uma resposta anti-tumoral bastante reduzida quando utilizados em monoterapia. As razões envolvidas na resistência das células tumorais aos fármacos convencionais podem variar de doente para doente e podem incluir alterações no metabolismo do fármaco (muitas vezes ditadas pela existência de cirrose hepática), a existência de mecanismos de evasão à apoptose, alterações nos mecanismos de reparação do ADN, a presença de células estaminais tumorais, alterações no microambiente tumoral e a expressão de proteínas transmembranares de efluxo (Chan & Lung 2004; Casalta-Lopes et al. 2011).

A glicoproteína P (PGP, do inglês *P-glycoprotein*), a MRP1 e a proteína de resistência pulmonar (LRP, do inglês *lung resistance-related protein*) são proteínas transmembranares de efluxo, conhecidas por serem proteínas de multirresistência (MDR, do inglês *multidrug resistance*) e cuja sobre-expressão celular é capaz de potenciar a ineficácia da quimioterapia (Brito 2014; Casalta-Lopes et al. 2011; Brito et al. 2014; Tsang et al. 2003).

Os resultados pouco eficazes da quimioterapia sistémica de amplo espectro têm potenciado a procura de terapêuticas dirigidas para alvos moleculares específicos, capazes de aumentar a resposta terapêutica e diminuir substancialmente a toxicidade nos tecidos não-alvo (Brito 2014). Na verdade, a terapia molecular dirigida, que atua especificamente em vias de sinalização desreguladas, tem-se afirmado como uma promessa no tratamento do carcinoma hepatocelular, particularmente para o carcinoma hepatocelular em estadios avançados (Cervello et al. 2012).

O sorafenib, descoberto em 1990 e aprovado em 2007, é o primeiro inibidor oral multikinase a ser desenvolvido (Bruix & Sherman 2011). Este fármaco inibe a atividade de diversas tirosinas-quinases envolvidas na angiogénese e na progressão tumoral, incluindo as quinases serina/treonina (como a Raf-1 ou a RafB *wild type*), essenciais para a proliferação da célula tumoral (Liu et al. 2006). O sorafenib atua ainda em vários recetores tirosina-quinase envolvidos na angiogénese, como por exemplo, o recetor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor*) tipo 1, 2 e 3, o recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR, do inglês *platelet-derived growth factor receptor*), o FLT3 (do inglês *fms-related tyrosine kinase*), o RET (do inglês *rearranged during transfection*) e o c-kit (Wrzesinski et al. 2013; Cervello et al. 2012; Liu et al. 2006; Furuse 2008).

Sabe-se também que o sorafenib induz a apoptose em células de leucemia humana e em outras linhas celulares tumorais humanas através da inibição da tradução e da regulação negativa da proteína anti-apoptótica MCL-1 (Liu et al. 2006). No entanto, os mecanismos moleculares através dos quais o sorafenib exerce a sua atividade anti-tumoral estão longe de estarem totalmente clarificados. Alguns estudos indicam que a inibição da Raf-1 pelo

sorafenib sensibiliza as células tumorais para a radioterapia e para a quimioterapia, implicando tal facto a redução das doses ou concentrações utilizadas e, conseqüentemente, dos efeitos secundários induzidos no doente (Liu et al. 2006). Na verdade, uma vez que não existe um mecanismo molecular patognomónico ou dominante no carcinoma hepatocelular, a utilização combinada de várias estratégias terapêuticas tem ditado os resultados mais encorajadores obtidos até agora.

Apesar do sorafenib ser o primeiro agente a melhorar a sobrevivência de doentes com carcinoma hepatocelular em estadio avançado e de ser geralmente bem tolerado, diversos resultados em termos de segurança e eficácia têm sido divulgados. Até agora, alguns doentes revelaram toxicidade elevada, nomeadamente reações adversas como a eritrodisestesia palmo-plantar, bem como sobrevivência reduzida (Furuse 2008). Para além disto, os doentes apresentaram diarreia, fadiga e perda de peso (Wrzesinski et al. 2013).

Para além do sorafenib, existem outras moléculas para terapia dirigida a alvos moleculares no carcinoma hepatocelular sob intensa investigação. Englobam-se neste tipo os inibidores da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) como a própria rapamicina, também designada por sirolimus, e seus análogos como o temsirolimus e o everolimus. Outra classe de fármacos dirigidos a alvos moleculares com utilidade no carcinoma hepatocelular são os inibidores do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) como o erlotinib, o gefitinib, o cetuximab, o lapatinib e o vandetanib. Também o potencial anti-cancerígeno do bevacizumab, um anticorpo monoclonal recombinante humanizado dirigido ao VEGF, e do linifanib, um inibidor oral da tirosina-cinase, dirigido ao VEGF e ao PDGF, têm sido investigados (Simão 2014).

Para além destas moléculas, alguns grupos de investigação têm tentado testar a aplicabilidade de compostos hormonais, como o tamoxifeno, da imunoterapia ou de outras terapias alternativas, tendo por base compostos naturais, no tratamento do carcinoma hepatocelular (Simão 2014; Wrzesinski et al. 2013; Johnson 2000).

Tendo em conta o flagelo que o carcinoma hepatocelular representa atualmente, é importante encontrar terapias eficazes que permitam reduzir a taxa de morbilidade e mortalidade desta doença. A aplicação da membrana amniótica, já clinicamente utilizada em diversas patologias surge, no contexto desta tese, como uma opção terapêutica para o carcinoma hepatocelular.

# Capítulo 2

## Objetivos



A aplicação da membrana amniótica humana como terapia na doença oncológica é uma abordagem que tem vindo a ser explorada ao longo da última década pela comunidade médica e científica, como já referido no capítulo 1. No entanto, apesar dos esforços realizados até agora, ainda não se conhecem totalmente os mecanismos de ação através dos quais a membrana amniótica atua nas células cancerígenas e/ou no seu microambiente. Curiosamente, resultados já publicados parecem indicar que os mecanismos de ação da membrana amniótica diferem mediante o perfil do tumor em que este tecido é aplicado. Por ser uma ideia recente e, conseqüentemente, pouco estudada, torna-se imperativo realizar vários estudos em contexto laboratorial que permitam determinar a aplicabilidade desta terapia anti-cancerígena não convencional, bem como clarificar as suas vias de ação.

Devido às peculiares e atrativas propriedades da membrana amniótica, bem como à facilidade com que esta pode ser obtida, processada e transportada, este tecido é já utilizado em diversas áreas clínicas. Também na doença do fígado, especificamente no tratamento da fibrose e da cirrose hepática, a membrana amniótica parece revelar inegável utilidade terapêutica.

Relativamente à aplicação da membrana amniótica humana na oncologia, sabe-se que este biomaterial possui propriedades anti-inflamatórias, anti-angiogénicas e pro-apoptóticas que poderão ditar a sua ação anti-cancerígena. A aplicabilidade da membrana amniótica no tratamento do carcinoma hepatocelular, uma neoplasia que apresenta uma elevada taxa de mortalidade em todo o mundo, é de inegável importância, não tendo sido até agora considerada. A elevada taxa de mortalidade decorrente deste tumor primário do fígado deve-se ao facto deste ser normalmente detetado em estadio avançado. Por outro lado, o carcinoma hepatocelular tem um perfil radioresistente e quimioresistente, não havendo atualmente opções terapêuticas satisfatórias. A investigação de novas opções terapêuticas, capazes de contrariar a evolução do processo carcinogénico, pode vir a determinar a alteração das assustadoras estatísticas associadas ao carcinoma hepatocelular.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal determinar o potencial anti-cancerígeno da membrana amniótica humana no cancro humano, particularmente no carcinoma hepatocelular, e investigar as suas vias de atuação celular através de diversos *modelos in vitro* e *in vivo*.

Para tal, otimizámos o processo de colheita, de receção e de obtenção de extratos das membranas amnióticas humanas (hAMPE, do inglês *human amniotic membrane protein extracts*).

Posteriormente, o efeito dos hAMPE em linhas celulares de cancro humano, incluindo em três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, bem como numa linha celular humana não tumorigénica, foi avaliado através de diversos ensaios de citotoxicidade. Através de diferentes modelos *in vitro*, foi objetivo deste trabalho avaliar o impacto dos hAMPE na viabilidade e na morte celular, através de análise morfológica celular e do estudo da expressão de diversos marcadores envolvidos na regulação da morte celular. O efeito dos hAMPE ao nível do stresse oxidativo, do ADN, do ciclo celular e das proteínas reguladoras do

núcleo celular, como a P53, a P21 e a  $\beta$ -catenina, foram também alvo de investigação. O estudo do efeito dos hAMPE na expressão de algumas isoformas dos GLUT e das proteínas de resistência foi também considerado objetivo deste estudo. Foi similarmente nosso propósito avaliar o efeito da terapia combinada entre os hAMPE e alguns agentes vulgarmente utilizados na terapia convencional do carcinoma hepatocelular, como o 5-FU, a doxorubicina, a cisplatina e o sorafenib.

Para além da realização dos estudos *in vitro*, foi também avaliado *in vivo* o potencial anti-cancerígeno dos hAMPE através do desenvolvimento de modelos animais heterotópicos de carcinoma hepatocelular e da implementação de um protocolo terapêutico adequado, com consequente análise histopatológica *ex vivo* dos tumores desenvolvidos.

# Capítulo 3

## Materiais e métodos



Neste trabalho foram utilizados diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como inúmeras técnicas de biologia celular e molecular, que se encontram descritas e ilustradas ao longo deste capítulo. Após a realização de um ensaio preliminar, em que foram utilizadas diversas linhas celulares de diferentes tipos de cancro humano, foram selecionadas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano para aprofundar os estudos relativos ao efeito anti-cancerígeno da membrana amniótica humana pois foram as que apresentaram maior sensibilidade à terapêutica proposta. O efeito da membrana amniótica foi também avaliado numa linha celular humana não tumorigénica.

## 3.1 Membrana amniótica humana

### 3.1.1 Colheita

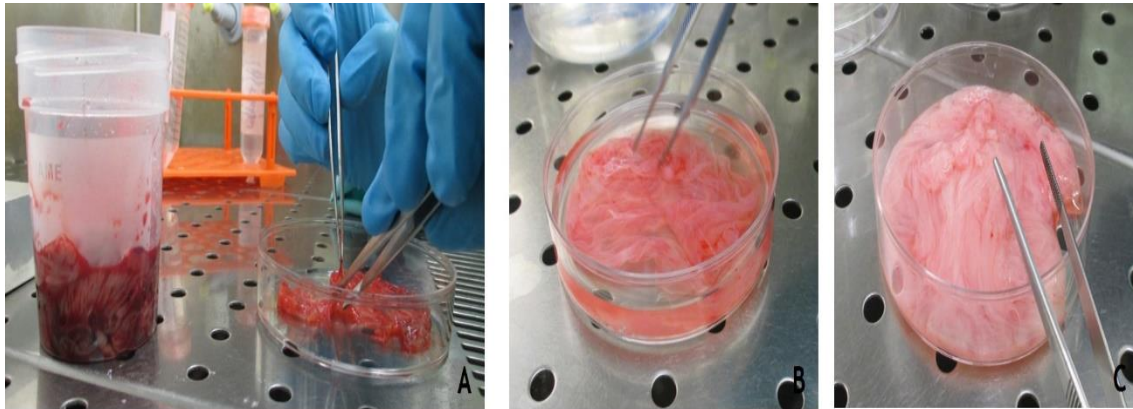
As membranas amnióticas humanas foram obtidas a partir de dadoras submetidas a cesariana eletiva, sem antecedentes médico-sociais, sem história de intercorrências clínicas e com exames serológicos negativos para o VIH, o VHB, o VHC e a sífilis. Neste estudo não foram utilizadas membranas amnióticas provenientes de partos eutócicos para eliminar o risco de contaminação pela população microbiana vaginal, tanto saprófita como patogénica.

Após obtenção do consentimento informado, redigido de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (projeto aprovado a 25 de Janeiro de 2013 com a referência CHUC-70-12 - anexo A e B), a colheita das membranas amnióticas foi realizada no Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra pela equipa médica responsável. Imediatamente após a colheita, as membranas amnióticas foram condicionadas em cloreto de sódio 0,9% (B. Braun) em recipiente estéril e hermético e posteriormente transportadas para o laboratório.

### 3.1.2 Receção

Após receção no laboratório, o recipiente utilizado para transportar as membranas amnióticas foi aberto no interior de uma câmara de fluxo laminar (Heraeus Holten, HBB 2448). Sob condições de assepsia, as membranas amnióticas foram colocadas em placas de Petri (Corning) e lavadas com uma solução de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) constituída por 137mM de cloreto de sódio (Sigma, S7653), 2,7mM de cloreto de potássio (Sigma, P9333), 2mM de fosfato de potássio monobásico (Sigma, P0662), 10mM de fosfato de sódio monobásico (Sigma, S3139), com pH de 7,4 e suplementada com 2% de antibiótico/antimicótico (10 000U/mL penicilina, 10mg/mL estreptomina e 25µg/mL

anfotericina - Sigma, A5955). As membranas amnióticas foram lavadas várias vezes com esta solução até todo o sangue ser eliminado (figura 3.1).



**Figura 3.1** - Receção das membranas amnióticas. Após receção no laboratório (A), as membranas amnióticas foram lavadas com uma solução de PBS suplementada com antibiótico/antimicótico com o objetivo de remover o sangue (B) e assim obter um tecido pronto a utilizar (C). Propriedade da autora.

### 3.1.3 Extração e quantificação das proteínas

Com o objetivo de preparar os hAMPE, recorreu-se a um protocolo modificado baseado no trabalho de Shao et al. (Shao et al. 2004). As membranas amnióticas foram inicialmente cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma pinça e de um bisturi, desfeitas em PBS com o auxílio de uma pequena picadora (Tefal, Optimo Compact) e colocadas num tubo de centrífuga (Corning). Após homogeneização (Heidolph Multifix M80), com recurso a um homogeneizador de Potter-Elvehjem (Thomas B307), os homogeneizados tecidulares foram colocados alternadamente num banho de ultrassons (Eurosonic 22) e gelo (1 minuto cada, durante 3 vezes) e posteriormente centrifugados a 14000xG durante 15 minutos à temperatura de 4°C (Hettich Mikro 22R). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram armazenados a -80°C (Thermo Scientific, HERAFreeze HFU T Series). Todo o protocolo foi executado em gelo.

Posteriormente, os sobrenadantes foram filtrados, utilizando um filtro de 0,45µm (Whatman/GE Healthcare, 10462100), em ambiente estéril e em condições de assepsia, tendo sido posteriormente aliquotados para diferentes tubos de centrífuga. As proteínas presentes no extrato foram quantificadas com recurso ao NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer, USA).

## 3.2 Culturas celulares

No estudo experimental preliminar foram utilizadas as seguintes linhas celulares de cancro humano: cancro da próstata (PC-3 e LNCaP), cancro da mama (HCC1806, MCF7 e HCC1954), cancro do cólon (LS1034, WiDr e C2BBe1), cancro do pulmão (A549 e H1299), cancro do pâncreas (PANC-1 e MIA PaCa-2), carcinoma hepatocelular (HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7), colangiocarcinoma (TFK-1), melanoma (A-375), osteossarcoma (MNNG/HOS), cancro do endométrio (ECC-1), cancro da bexiga (HT-1376) e cancro do esófago (OE19). Neste estudo experimental foi também utilizada uma linha celular humana não tumorigénica de origem fibroblástica (HFF1).

Todas as linhas celulares foram adquiridas à ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*), exceto a linha celular TFK-1, obtida no banco de células da DSMZ (do alemão *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*), a linha celular HuH7, obtida no banco de células da JCRB (do inglês *Japanese Collection of Research Bioresources*) e a linha celular OE19, adquirida à ECACC (do inglês *European Collection of Cell Cultures*).

As linhas celulares foram descongeladas e propagadas em cultura aderente de acordo com as recomendações dos respetivos fornecedores. As linhas celulares MCF7, WiDr, C2BBe1, HuH7, HepG2, Hep3B2.1-7, H1299, MIA PaCa-2, PANC-1, A-375, HT-1376, MNNG/HOS e HFF1 foram propagadas no meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Sigma, D5648), com pH de 7,4, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum* - Sigma, F7524), 1% de antibiótico/antimicótico e 0,25% de piruvato de sódio (Gibco, 11360). O meio de cultura da linha celular PANC-1 foi também suplementado com 2,5% de soro equino (ATCC, 30-2040). As linhas celulares PC-3, LNCaP, HCC1806, HCC1954, LS1034, A549, TFK-1, ECC-1 e OE19 foram propagadas no meio de cultura RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Sigma, R6504), com pH de 7,4, suplementado com 10% de FBS, 1% de antibiótico/antimicótico e 1% de piruvato de sódio. As linhas celulares foram mantidas numa incubadora (Binder) à temperatura de 37°C em atmosfera humidificada constituída por 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

Como as linhas celulares utilizadas se desenvolvem em culturas aderentes, foi necessário destacá-las dos respetivos frascos de cultura (Corning) e preparar as suspensões celulares necessárias para a realização dos vários estudos. Com este objetivo as células foram incubadas com 2mL de uma solução de 0,25% de tripsina e de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) [2,5g/L de tripsina porcina e 0,2g/L de EDTA.4Na em solução salina equilibrada de Hank's com vermelho de fenol - Sigma T4049] à temperatura de 37°C, após breve lavagem celular com PBS. Após o destacamento celular, a tripsina foi inativada com 5mL do respetivo meio de cultura. A suspensão celular foi posteriormente centrifugada a 200xG durante 5 minutos. Após centrifugação, foi adicionado um volume conhecido de meio de cultura ao *pellet* celular e procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano (Sigma, T0776) na concentração de

1:1. Para tal, utilizou-se um hemocítmetro (Marienfeld) num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS100) com ampliação de 100 vezes. Após a contagem das células, o volume das suspensões celulares foi ajustado com meio de cultura com o objetivo de obter a concentração celular desejada para cada estudo (Louis & Siegel 2011).

## 3.3 Efeito em vários tipos de cancro

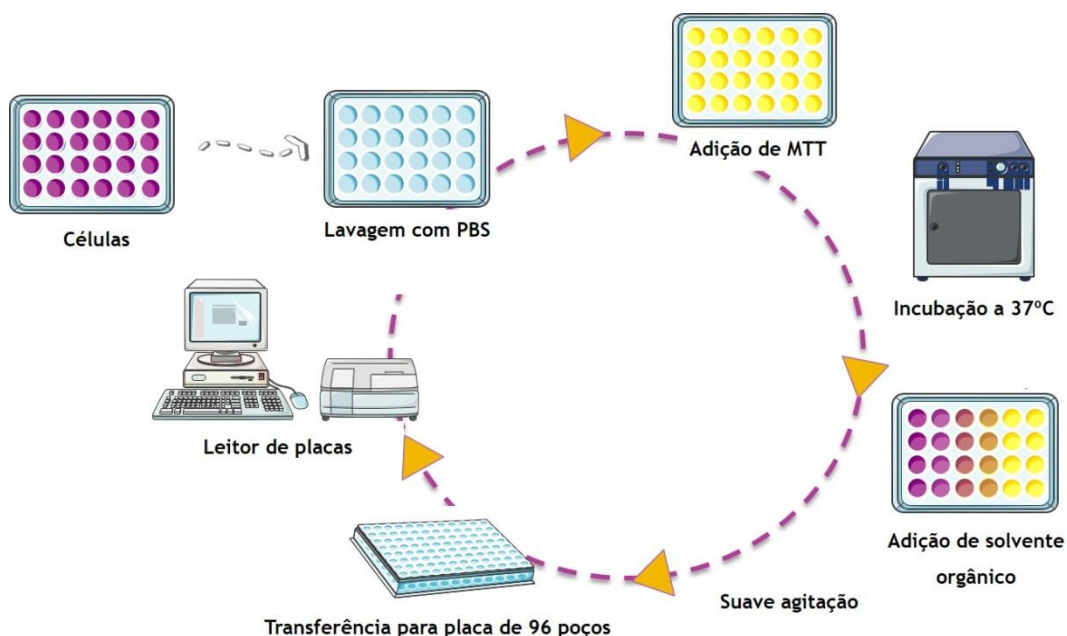
### 3.3.1 Citotoxicidade

#### Atividade metabólica

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE na atividade metabólica das células das várias linhas celulares de cancro humano estudadas, recorreu-se ao ensaio do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio colorimétrico baseia-se na redução do MTT, um corante hidrossolúvel de cor amarelo, com formação de cristais de formazano, de cor púrpura, devido à ação das enzimas desidrogenases. Os cristais de formazano formados podem ser observados ao microscópio no citoplasma celular ou dissolvidos com solventes orgânicos, sendo possível a sua posterior quantificação através da utilização de um espectrofotómetro. Desta forma, a redução do MTT e consequente formação de cristais de formazano é diretamente proporcional à atividade metabólica celular (Mosmann 1983; Vega-Avila & Pugsley 2011; Kupcsik 2011; Riss et al. 2013).

Para avaliar o efeito dos hAMPE na atividade metabólica das células das várias linhas celulares de cancro humano consideradas (PC-3, LNCaP, HCC1806, MCF7, HCC1954, LS1034, WiDr, C2BBel, A549, H1299, PANC-1, MIA PaCa-2, HuH7, HepG2, Hep3B2.1-7, TFK-1, A-375, MNNG/HOS, ECC-1, HT-1376 e OE19), foram preparadas suspensões com  $5 \times 10^4$  células/mL que foram posteriormente distribuídas por placas de 24 poços (Corning). Após 24 horas, as células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. O ensaio do MTT foi realizado após 72 horas de incubação. Para tal, o meio de cultura foi descartado e de seguida foi adicionado PBS a cada poço com o objetivo de lavar as células. Posteriormente, adicionaram-se  $150 \mu\text{L}$  de uma solução de MTT de  $0,5 \text{ mg/mL}$  em PBS, com pH de 7,4 (Sigma, M2128) a cada poço. Após 3 horas de incubação à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ ,  $150 \mu\text{L}$  de uma solução de isopropanol (Sigma, 278475) com  $40 \text{ mM}$  de ácido clorídrico fumante a 37% (Merck Millipore, 100317) foram adicionados a cada poço. As placas de cultura foram colocadas sob agitação constante (Diagnostic Products Corporation) até solubilização total dos cristais de formazano. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e a absorvância foi avaliada a  $570 \text{ nm}$  com um filtro de referência de  $620 \text{ nm}$ , utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção (Biotek® Synergy HT). O ensaio foi

realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE, tal como ilustrado na figura 3.2. Foram selecionadas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano para aprofundar os estudos relativos ao efeito anti-cancerígeno da membrana amniótica por estas células apresentarem elevada sensibilidade à terapêutica, tal como verificado nos resultados obtidos na técnica do MTT.



**Figura 3.2** - Técnica do MTT. O MTT, um corante amarelo hidrossolúvel, é reduzido com formação de cristais de formazano, de cor púrpura, devido à ação das enzimas desidrogenases. Os cristais formados, proporcionais à atividade metabólica celular, podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, sendo possível a sua posterior quantificação. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 3.4 Efeito no carcinoma hepatocelular

### 3.4.1 Citotoxicidade

#### Atividade metabólica

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE na atividade metabólica das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se ao ensaio do MTT. Para tal, foram preparadas suspensões com  $5 \times 10^4$  células/mL que foram posteriormente distribuídas por placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. O ensaio do MTT foi realizado após 24 e 72 horas de incubação, de acordo com o protocolo previamente descrito. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE. O mesmo protocolo foi

utilizado para avaliar o efeito dos hAMPE na atividade metabólica das células da linha celular humana não tumorigénica de origem fibroblástica (HFF1), tendo para isso sido utilizada a maior concentração ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e maior período de incubação (72 horas) dos hAMPE.

## Conteúdo proteico

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo proteico das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se ao ensaio da sulforodamina B (SRB). A SRB é um corante aminoxanteno de cor rosa com dois grupos sulfónicos que lhe conferem a capacidade de se ligar aos aminoácidos básicos em células previamente fixadas. A ligação do corante aos aminoácidos é favorecida por condições ligeiramente ácidas. É possível dissociar a SRB dos aminoácidos em condições alcalinas e posteriormente quantificá-la por espectrofotometria. Desta forma, a quantidade de corante ligado aos aminoácidos é diretamente proporcional ao conteúdo proteico (Vichai & Kirtikara 2006; Houghton et al. 2007).

Para avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo proteico das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, foram preparadas suspensões com  $5 \times 10^4$  células/mL que foram posteriormente distribuídas por placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. O ensaio da SRB foi realizado após 24 e 72 horas de incubação. Para tal, o meio de cultura foi descartado e de seguida foi adicionado PBS a cada poço com o objetivo de lavar as células, tendo este procedimento sido repetido duas vezes. Para fixar as células, estas foram incubadas durante 1 hora à temperatura de  $4^\circ\text{C}$  (Whirlpool) com  $200\mu\text{L}$  de uma solução gelada a  $-20^\circ\text{C}$  com 1% de ácido acético (Sigma, 33209) em metanol (VWR, BDH1135-4LP). Esta solução foi posteriormente descartada e foram adicionados  $200\mu\text{L}$  de uma solução com 0,5% de SRB (Sigma, S9012) em 1% de ácido acético. Após incubação no escuro durante 2 horas, as células foram lavadas com água com o objetivo de remover o excesso de corante. Para dissociar o SRB dos aminoácidos, adicionaram-se cerca de  $200\mu\text{L}$  de uma solução com 10mM de Trizma base (Sigma, T1503), com pH de 10, às células e as placas de cultura foram posteriormente colocadas sob agitação constante. De seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância foi avaliada a 540nm com um filtro de referência de 690nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência dos hAMPE, que funcionaram como controlo, e na presença dos hAMPE. O mesmo protocolo foi utilizado para avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo proteico das células da linha celular humana não tumorigénica de origem fibroblástica (HFF1), tendo para isso sido utilizada a maior concentração ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e o maior período de incubação (72 horas) dos hAMPE.

## Conteúdo de ácido desoxirribonucleico

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo de ADN das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se ao ensaio do violeta de cristal. Em solução aquosa, o violeta de cristal dissocia-se nos iões  $CV^+$  e  $Cl^-$ , que são capazes de permear a membrana celular. O ião  $CV^+$  apresenta elevada afinidade para os componentes celulares carregados negativamente, como o ADN, corando desta forma as células de roxo. Após utilização de um solvente orgânico, é possível quantificar o corante incorporado nas células através da utilização de um espectrofotómetro. Desta forma, a absorvância registada é diretamente proporcional ao conteúdo de ADN celular (Vega-Avila & Pugsley 2011).

Para avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo de ADN das células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 de carcinoma hepatocelular, foram preparadas suspensões com  $5 \times 10^4$  células/mL que foram posteriormente distribuídas por placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com hAMPE nas concentrações de  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . O ensaio do violeta de cristal foi realizado após 24 e 72 horas de incubação. Para tal, o meio de cultura foi aspirado e de seguida as células foram lavadas com PBS, tendo sido posteriormente fixadas com  $150 \mu\text{L}$  de metanol durante 10 minutos. Posteriormente, o metanol foi aspirado e foram adicionados  $200 \mu\text{L}$  de violeta de cristal (Sigma, C3886) na concentração de  $1 \text{mg}/\text{mL}$  às células. Após 10 minutos de incubação, o corante foi aspirado e as células foram lavadas com água até todo o corante em excesso ser eliminado. Após lavagem,  $200 \mu\text{L}$  de uma solução de isopropanol com  $40 \text{mM}$  de ácido clorídrico fumante a 37% foram adicionados a cada poço, sendo as placas posteriormente colocadas sob agitação constante. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorvância foi avaliada a  $570 \text{nm}$ , usando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE. O mesmo protocolo foi utilizado para avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo de ácido desoxirribonucleico da linha celular humana não tumorigénica de origem fibroblástica (HFF1), tendo para isso sido utilizada a maior concentração ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e maior período de incubação (72 horas) dos hAMPE.

Na impossibilidade de avaliar todas as concentrações e períodos de incubação previamente considerados neste estudo, todos os seguintes ensaios foram realizados utilizando a maior concentração ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e maior período de incubação (72 horas) dos hAMPE nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano.

### 3.4.2 Viabilidade e morte celular

#### Morfologia

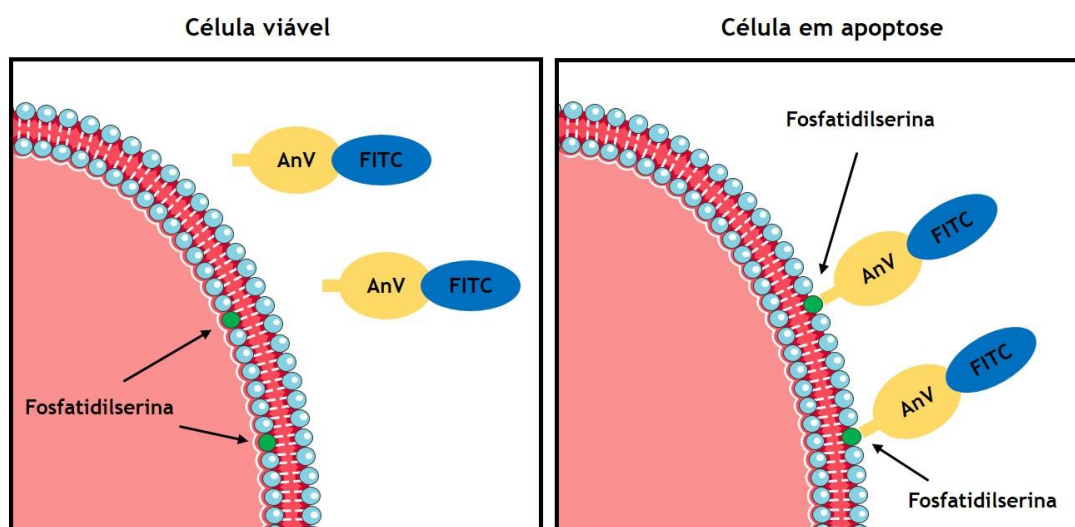
Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE na viabilidade e na morte das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à análise morfológica por microscopia ótica após utilização da coloração de May-Grünwald-Giemsa. O corante May-Grünwald-Giemsa é constituído por derivados do azul-de-metileno (corante básico) e por eosina (corante ácido). Esta coloração baseia-se na ligação dos corantes catiónicos aos componentes ácidos das células (como o núcleo), conferindo-lhes uma cor azulada, enquanto os corantes aniónicos são capazes de corar os componentes alcalinos (como o citoplasma), atribuindo-lhes uma cor vermelho-púrpura (Gonçalves et al. 2013). Através desta coloração, e tendo em conta as diferentes características morfológicas das células vivas e mortas, é possível verificar através de microscopia ótica se existe morte celular e qual é o tipo de morte celular induzida pelos hAMPE (Edinger & Thompson 2004).

Para avaliar o efeito dos hAMPE na viabilidade e na morte das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação,  $5 \times 10^4$  células foram centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos, depois da respetiva tripsinização e contagem. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos. De seguida, as células foram ressuspensas em  $60 \mu\text{L}$  de FBS e foram preparados os esfregaços após a adição de  $20 \mu\text{L}$  da suspensão celular na superfície de uma lâmina (VWR) devidamente identificada. Após secagem durante a noite, as lâminas foram colocadas na horizontal e adicionou-se a cada uma  $1,5 \text{ mL}$  de solução de May-Grünwald (Sigma, MG500), constituída por 0,3% de metanol e diluída na proporção de 1:1 aquando da utilização. Após 3 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas com  $1,5 \text{ mL}$  de água durante 1 minuto. Posteriormente,  $2,5 \text{ mL}$  da solução de Giemsa, constituída por 1g de corante Giemsa (Sigma, GS500) dissolvido em  $66 \text{ mL}$  de glicerol (Sigma, G5516) e  $66 \text{ mL}$  de metanol, diluído na proporção de 1:8 aquando da utilização, foram adicionados a cada lâmina. Após 15 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas com água para retirar o excesso de corante e foram deixadas secar. As lâminas foram observadas num microscópio ótico (Zeiss Axioskop 2) e fotografadas com uma câmara digital (Zeiss AxioCam ICc 3), tendo as imagens sido posteriormente processadas no programa AxioVision LE. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

## Tipos de morte celular

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a morte por apoptose ou necrose nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização da anexina V e do iodeto de propídeo, respetivamente.

As células eucarióticas mantêm uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos entre o folheto interno e o folheto externo da membrana plasmática. Sabe-se atualmente que a perda de assimetria e a consequente alteração da distribuição dos fosfolípidos na bicamada lipídica, sem alteração da integridade da membrana plasmática, é um evento desencadeado pela apoptose celular. Desta forma, quando se inicia a morte celular por apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, do folheto interno para o folheto externo da membrana celular, como ilustrado na figura 3.3. A anexina V é uma molécula com elevada afinidade por fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina, ligando-se a esta. Quando conjugada com um fluorocromo, a anexina V permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana celular e assim identificar as células em apoptose (Engeland et al. 1998; Elmore 2007).

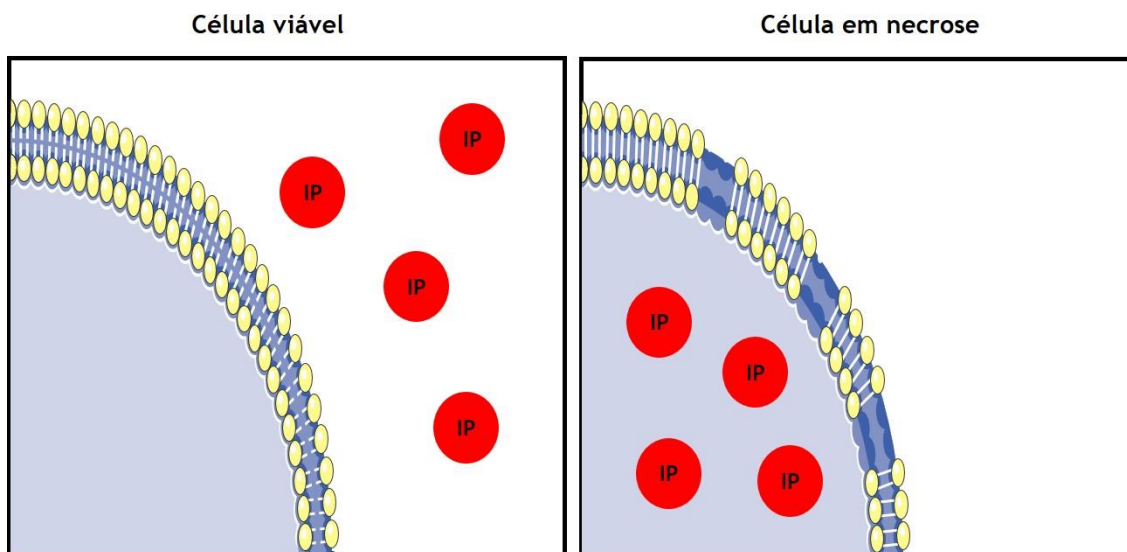


**Figura 3.3** - Detecção da apoptose com recurso à anexina V. Durante a apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana celular, ficando desta forma exposta à anexina V (AnV) conjugada com um fluorocromo (FITC), que permite detetar e identificar as células em apoptose. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Para determinar se os hAMPE induziam a morte por apoptose nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a  $1300 \times G$  durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo o programa anteriormente referido. Posteriormente, as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro com  $100 \mu\text{L}$  de tampão de ligação constituído por

0,01M de N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES - Sigma, H7523), 0,14M de cloreto de sódio e 0,25mM de cloreto de cálcio (Sigma, C4901) e por 2µL de anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate* - Immunostep, ANXVF). Após lavagem celular com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, 200µL de tampão de ligação foram adicionados às células e a fluorescência foi avaliada recorrendo a um comprimento de onda de excitação de 485/20nm e a um comprimento de onda de emissão de 528/20nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE.

Por outro lado, com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a morte por necrose nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização do iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo é um agente que é incapaz de permear as células viáveis devido à integridade da membrana celular. Quando a morte celular ocorre por apoptose tardia ou por necrose, a integridade da membrana celular fica comprometida e o iodeto de propídeo penetra nas células, intercalando-se aleatoriamente nos pares de bases constituintes da dupla cadeia de ADN, sendo a sua fluorescência largamente amplificada, tal como descrito na figura 3.4 (Abrantes et al. 2010; Vitale et al. 1993; Cevik & Dalkara 2003).



**Figura 3.4** - Detecção da necrose com recurso ao iodeto de propídeo. Durante a necrose, o iodeto de propídeo (IP) penetra nas células, intercala-se no ADN e a sua fluorescência é amplificada. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Desta forma, para determinar se os hAMPE induziam a morte por necrose nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia anteriormente descrita. Posteriormente, as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro com 100µL de tampão de ligação e 1µL de

iodeto de propídeo (Immunostep). Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, 200µL de solução tampão de ligação foram adicionados às células e a fluorescência foi determinada com um comprimento de onda de excitação de 485/20nm e um comprimento de onda de emissão de 590/35nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE.

### 3.4.3 Vias de morte celular

#### BAX e BCL2

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da expressão das proteínas BAX e BCL2 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de anticorpos específicos contra as proteínas de interesse através da técnica de imunofluorescência.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia previamente descrita. Posteriormente, as células foram incubadas durante 15 minutos com 100µL de solução de fixação (IntraCell, Immunostep). Após nova lavagem com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 1300xG, adicionaram-se às células 100µL de solução de permeabilização (IntraCell, Immunostep) assim como o anticorpo primário anti-BAX conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*; 1:50 - Santa Cruz Biotechnology, sc-20067) ou o anticorpo primário anti-BCL2 conjugado com o fluorocromo FITC (1:50 - Santa Cruz Biotechnology, sc-509). As células foram depois incubadas durante 15 minutos no escuro. Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, foram adicionados 200µL de PBS às células e estas foram posteriormente excitadas com uma luz com comprimento de onda de 485/20nm. Para a deteção da fluorescência, foram utilizados os comprimentos de onda de emissão de 590/35nm para o PE e de 528/20nm para o FITC, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE.

#### Citocromo C

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da expressão do citocromo C nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína de interesse através da técnica de imunofluorescência.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo o programa anteriormente referido. Posteriormente, as células foram incubadas durante 15 minutos com  $100 \mu\text{L}$  de solução de fixação. Após lavagem com PBS por centrifugação a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos, adicionaram-se às células  $100 \mu\text{L}$  de solução de permeabilização e o anticorpo primário anti-citocromo C conjugado com o fluorocromo FITC (1:50 - Santa Cruz Biotechnology, sc-13561) ficando em incubação, no escuro, durante 15 minutos. Após lavagem com PBS por centrifugação a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos,  $200 \mu\text{L}$  de PBS foram adicionados às células e estas foram posteriormente excitadas com uma luz de comprimento de onda de  $485/20 \text{nm}$ . Para deteção da fluorescência, foi utilizado o comprimento de onda de emissão de  $528/20 \text{nm}$ , utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **Potencial de membrana mitocondrial**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração do PMM nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização do iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1). O JC-1 é um catião lipofílico que se acumula na mitocôndria de forma dependente do PMM, podendo a fluorescência emitida variar entre o verde (JC-1 na forma de monómeros) e o vermelho (JC-1 na forma de agregados) mediante a sua concentração mitocondrial. Consequentemente, o aumento do PMM é indicado pela diminuição da razão entre a fluorescência verde (monómeros) e a fluorescência vermelha (agregados) (Cossarizza et al. 1993; Salvioli et al. 1997; Smiley et al. 1991).

Para determinar se os hAMPE induziam a alteração do PMM nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas ( $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos) e lavadas com PBS por centrifugação segundo o protocolo anteriormente descrito. As células foram posteriormente incubadas durante 15 minutos, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e no escuro com  $1 \mu\text{L}$  de JC-1 (Molecular Probes, T-3168) na concentração de  $5 \text{mg}/\text{mL}$  em dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma, D5879) em  $1 \text{mL}$  de PBS. Após lavagem com PBS por centrifugação ( $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos),  $200 \mu\text{L}$  de PBS foram adicionados às células e a fluorescência foi avaliada num leitor de placas multi-deteção. A fluorescência emitida pelos monómeros foi determinada com comprimentos de onda de excitação e de emissão de  $485/20 \text{nm}$  e  $530/25 \text{nm}$ , respetivamente. Por outro lado, a fluorescência emitida pelos agregados foi determinada com comprimentos de onda de excitação e de emissão de  $528/20 \text{nm}$  e  $590/35 \text{nm}$ , respetivamente. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

## Caspases

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da expressão das caspases 3, 8 e 9 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se a anticorpos específicos contra as referidas proteínas para quantificar a sua expressão através da técnica de *western blot*.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS gelado. Posteriormente, os extratos proteicos foram preparados em gelo com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de radioimunoprecipitação (RIPA), constituído por 150mM de cloreto de sódio, 50mM de Trizma base, 5mM de ácido tetracético etileno glicol (EGTA, do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid* - Sigma, E4378), 1% de Triton X-100 (Merk Millipore, 108603), 0,5% de desoxicolato de sódio (Sigma, 6750) e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate* - Sigma, 436143). Esta solução foi suplementada, aquando da utilização, com um *cocktail* de inibidores de proteases (cOmplete, Mini - Roche, 11836153001), um *cocktail* de inibidores de fosfatases (PhosSTOP - Roche, 04906845001) e 1mM de ditioneitol (DTT - Sigma, 43815). Após aplicação de um raspador (VWR) e do consequente destaque das células da superfície do frasco de cultura (Corning), estas foram colocadas num microtubo (VWR), que se encontrava em gelo. Após breve agitação no vórtex (RX3), as amostras foram alternadamente sonicadas, utilizando para tal uma amplitude de 35% (Vibra Cell, Sonic and Materials Inc. VC50) e seguidamente colocadas em gelo durante 10 segundos. Estes procedimentos foram repetidos três vezes. Após centrifugação (14000xG durante 15 minutos a 4°C), os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos devidamente identificados e armazenados a -80°C. A concentração proteica foi determinada através do método do ácido bicinonínico (BCA, do inglês *bicinchoninic acid* - Pierce BCA protein assay kit).

Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos em solução desnaturante constituída por 100mM de Trizma base, 100mM de glicina (Sigma, 50046), 4% de SDS, 8mM de ureia (Sigma, U6504) e 0,01% de azul de bromofenol (M&B). Para a realização da eletroforese, os géis de acrilamida foram polimerizados, colocados na tina de eletroforese (Bio-Rad) com tampão apropriado constituído por 2,5mM de Trizma base, 19,2mM de glicina, 0,01% de SDS e pH de 8,3 (Bio-Rad, 161-0772) e as amostras e o padrão de pesos moleculares (Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad) foram inseridos. Durante a eletroforese foi utilizada uma diferença de potencial constante de 80V durante 30 minutos, após os quais se aumentou a diferença de potencial para 150 V.

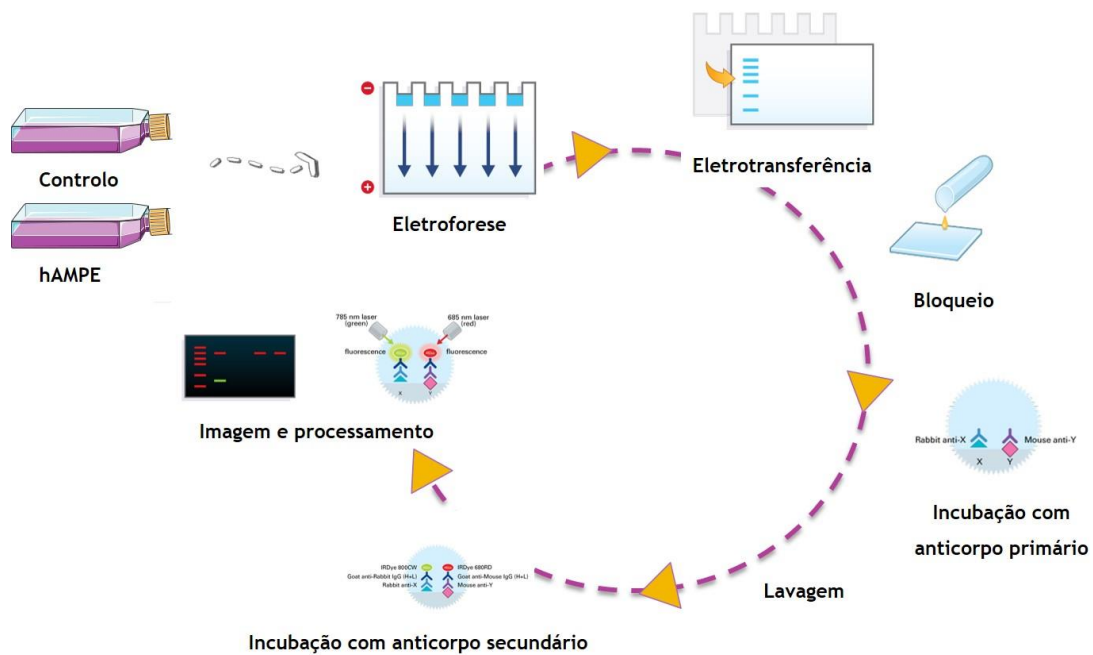
Após a eletroforese, os géis foram colocados em contacto direto com membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride* - Merck Millipore) previamente ativadas com metanol. A eletrotransferência decorreu com aplicação de uma diferença de potencial de 100V e com as membranas imersas numa solução constituída por

100mM de tampão N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS - Sigma, C2632), com pH de 11 e 10% de metanol. As membranas foram imediatamente bloqueadas com uma solução de TBST-BSA (do inglês *tris-buffered saline tween-20 - bovine serum albumine*), constituída por TBS (137mM de cloreto de sódio, 2,7mM de cloreto de potássio, 19mM de Trizma base, pH de 7,4), Tween-20 (1mL/L em TBS - Merck Millipore, 817072) e BSA a 4% (Sigma, A7906), sob agitação suave durante 1 hora. As membranas foram posteriormente incubadas durante a noite, à temperatura de 4°C e sob agitação constante com o anticorpo primário adequado para a proteína em questão, tal como descrito na tabela 3.1. No dia seguinte, as membranas foram lavadas várias vezes com uma solução de 1% de TBST e posteriormente sujeitas a incubação durante 1 hora, sob agitação constante, com o anticorpo secundário adequado, tal como descrito na tabela 3.1. As membranas foram novamente lavadas com uma solução de TBST a 1% e posteriormente incubadas com o substrato enzimático ECF (do inglês *elemental chlorine free* - Amersham Biosciences), durante 5 minutos.

**Tabela 3.1** - Anticorpos utilizados na técnica de *western blot* para detecção das caspases

Caspase	Anticorpo primário		Anticorpo secundário	
	Referência	Diluição	Referência	Diluição
3	Santa Cruz Biotechnology (sc-7148)	anti-caspase 3 1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-2007)	anti-coelho (1:5000)
8	Immunotech (IM3148)	anti-caspase 8 1:2000	GE Healthcare (RPN5781)	anti-rato (1:3000)
9	Santa Cruz Biotechnology (sc-8355)	anti-caspase 9 1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-2007)	anti-coelho (1:5000)

Após este período de incubação, as membranas foram reveladas utilizando para tal um leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000). Após nova ativação das membranas, estas foram submetidas a uma incubação com o anticorpo primário anti-β-actina (1:5000 - Sigma, A5441) e posteriormente com o anticorpo secundário anti-rato (1:3000 - GE Healthcare), conforme o procedimento descrito anteriormente. A quantificação da fluorescência foi realizada no programa ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics), através do desenho de regiões de interesse sobre as bandas com peso molecular correspondente às proteínas avaliadas. Foi calculada a razão entre a intensidade da banda correspondente às proteínas caspase 3, 8 ou 9 e da banda correspondente à proteína β-actina. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE, tal como ilustrado na figura 3.5.



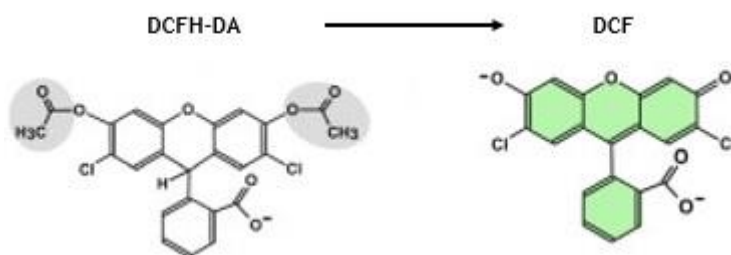
**Figura 3.5 - Western blot.** O western blot é uma técnica utilizada para detetar a expressão de proteínas através de um protocolo sequencial que envolve eletroforese, eletrotransferência, bloqueio, incubação com anticorpo primário, incubação com anticorpo secundário, obtenção de uma imagem e processamento com quantificação dos resultados. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

### 3.4.4 Stresse oxidativo e defesas antioxidantes

O efeito da membrana amniótica humana no stresse oxidativo foi avaliado nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano. Para tal, recorreu-se à deteção do peróxido de hidrogénio, do radical superóxido e da glutatona.

#### Peróxido de hidrogénio

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da expressão do peróxido de hidrogénio produzido pelas linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização da 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). A DCFH-DA é um composto não fluorescente capaz de atravessar a membrana celular e que, após clivagem do acetato por esterases no citoplasma e na presença do peróxido de hidrogénio, origina a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A DCF é um composto que emite fluorescência de forma proporcional à concentração intracelular de peróxido de hidrogénio, tal como ilustrado na figura 3.6 (Gomes et al. 2005; Abrantes et al. 2010).



**Figura 3.6** - Detecção de peróxido de hidrogénio. O DCFH-DA entra nas células e acumula-se principalmente no citoplasma. No citoplasma, o acetato é clivado por esterases e, na presença de peróxido de hidrogénio, o DCFH-DA origina o DCFH, um composto altamente fluorescente. Adaptado de (Tritto et al. 2012).

Para determinar se os hAMPE induziam alterações da produção do peróxido de hidrogénio pelas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo o programa anteriormente referido. As células foram posteriormente incubadas durante 45 minutos, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e no escuro com  $1 \mu\text{L}$  de uma solução de DCFH-DA em DMSO na concentração de  $5 \text{mM}$  (Sigma, D6883) em  $1 \text{mL}$  de PBS. Após lavagem com PBS por centrifugação a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos,  $200 \mu\text{L}$  de PBS foram adicionados às células e estas foram posteriormente excitadas com uma luz de comprimento de onda de  $485/20 \text{nm}$ . Para deteção da fluorescência, foi utilizado o comprimento de onda de emissão de  $528/20 \text{nm}$ , utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

## Radical superóxido

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da produção do radical superóxido nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização do dihidroetídio (DHE, do inglês *dihydroethidium*). O DHE atravessa a membrana celular e é convertido intracelularmente pelo radical superóxido em etídeo, um composto fluorescente que se intercala no ADN. O etídeo é um composto que emite fluorescência de forma proporcional à concentração intracelular de radical superóxido (Gomes et al. 2005).

Para determinar se os hAMPE induziam alteração na produção do radical superóxido pelas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos e seguidamente lavadas com PBS por centrifugação segundo o programa anteriormente referido. As células foram posteriormente incubadas durante 15 minutos, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e no escuro com  $5 \mu\text{L}$  de uma solução de DHE em DMSO com a concentração de  $1 \text{mM}$

(Sigma, 37291) em 1mL de PBS. Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, foram adicionados às células 200µL de PBS as quais foram posteriormente excitadas com uma luz de comprimento de onda de 530/25nm. Para a detecção da fluorescência, foi utilizado o comprimento de onda de emissão de 645/40nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

## **Glutathione**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da expressão da GSH nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização do 1-(4-cloromercuriofenilazo)-2-naftol, comumente designado por alaranjado de mercúrio. O alaranjado de mercúrio reage rapidamente com a GSH, dando origem a um produto de reação que emite fluorescência vermelha (Hedley & Chow 1994).

Para determinar se os hAMPE induziam a alteração da expressão da GSH nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e de seguida lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia anteriormente descrita. As células foram posteriormente incubadas durante 15 minutos, à temperatura de 37°C e no escuro com uma solução de 4µL de alaranjado de mercúrio na concentração de 10mM (Sigma, M7750) em acetona (Sigma, 34850) em 1mL de PBS. Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, foram adicionados às células 200µL de PBS. As células foram posteriormente excitadas com uma luz com comprimento de onda de 485/20nm. Para detecção da fluorescência, usou-se o comprimento de onda de emissão de 590/35nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **3.4.5 Núcleo celular e proteínas reguladoras**

O efeito da membrana amniótica humana no núcleo celular e respetivas proteínas reguladoras foi avaliado nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano. Para tal, os danos no ADN foram avaliados através do ensaio cometa e do ensaio de fragmentação com polietileno glicol (PEG)/Hoechst. Foi também estudado o ciclo celular, bem como a expressão da proteína P53, proteína P21 e proteína  $\beta$ -catenina.

## Danos no ácido desoxirribonucleico

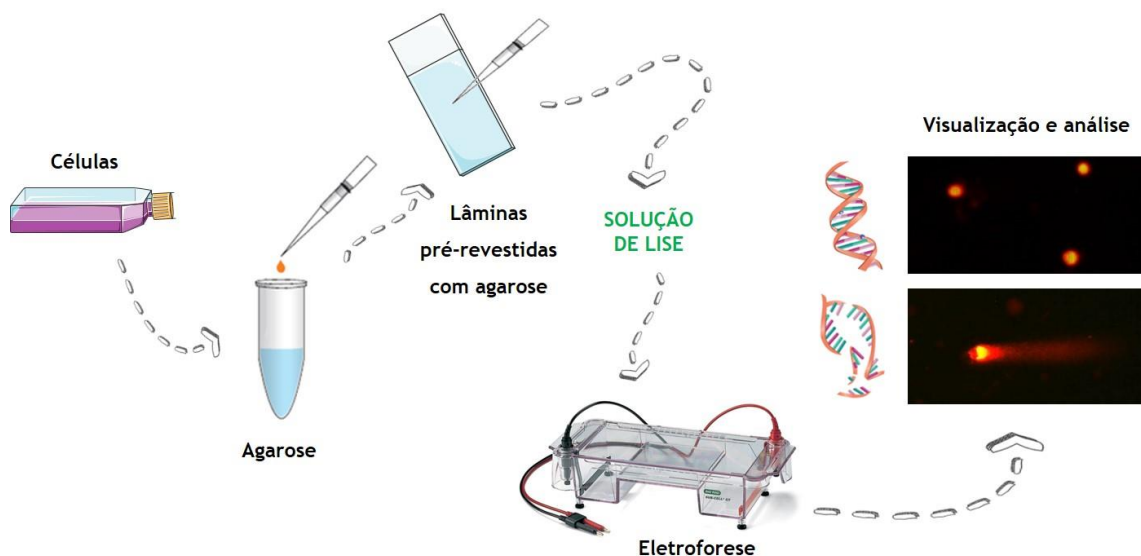
Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam danos no ADN das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se ao ensaio cometa e ao ensaio de fragmentação com PEG/Hoechst.

### i. Ensaio cometa

A eletroforese em gel de células individualizadas, também conhecida por ensaio cometa, é uma técnica que permite determinar danos no ADN. Nesta técnica, as células são embebidas num gel de agarose, lisadas e posteriormente submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. Sob condições alcalinas, esta técnica permite detetar vários tipos de danos no ADN, como quebras simples e quebras duplas. Desta forma, através da utilização de corantes apropriados e posterior observação ao microscópio, é possível quantificar os danos no ADN através das imagens obtidas com recurso a *software* específico. Quando não existem danos no ADN, este apresenta-se sob a forma de uma esfera, pois a ausência de extremidades livres e o elevado tamanho dos fragmentos evitam a sua rápida migração aquando da realização da eletroforese. Por outro lado, quando existem danos no ADN, este apresenta-se sob a forma de um cometa, pois a estrutura do ADN carregado negativamente adquire uma forma relaxada e as extremidades com quebras podem migrar em direção ao ânodo durante a eletroforese. Desta forma, o comprimento da cauda do cometa traduz a extensão dos danos no ADN. Na tentativa de quantificar os resultados, é possível determinar parâmetros como o comprimento da cauda, a percentagem de ADN presente na cauda dos cometas e o momento da cauda (que correlaciona o comprimento da cauda com a percentagem de ADN na mesma) e utilizá-los para exprimir os danos no ADN a nível da célula individualizada (Tice et al. 2000; Collins et al. 2008; Olive & Banáth 2006; Collins et al. 1997; Hartmann & Speit 1997; Fairbairn et al. 1995).

Para determinar se os hAMPE induziam danos no ADN das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, 50000 células foram centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos, depois da respetiva tripsinização e contagem. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas a  $1300 \times \text{G}$  durante 5 minutos. As células foram diluídas na proporção de 1:1 em 1% de agarose com baixo ponto de fusão (Sigma, A9414) e 1mL da suspensão celular foi aplicado em lâminas (Starfrost), previamente revestidas com 1,5% de agarose (Sigma, A2790). De seguida, cobriu-se a suspensão celular com uma lamela e a solidificação da agarose ocorreu à temperatura de  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Posteriormente, após retirada da lamela, as lâminas foram colocadas, durante a noite à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ , numa solução de lise alcalina constituída por 2,5M de

cloreto de sódio, 100mM de EDTA (Sigma, E6758), 10mM de Trizma base, DMSO a 10% e Triton X-100 a 1%. As lâminas foram de seguida colocadas em tampão de eletroforese constituído por 300mM de hidróxido de sódio e 1mM de EDTA, com pH superior a 13, durante 1 hora. A eletroforese em tina horizontal (Bio-Rad) decorreu com uma diferença de potencial de 254V e corrente de 600mA durante 15 minutos. As lâminas foram posteriormente embebidas em solução de neutralização constituída por 0,4M de Trizma base com pH de 7,5, tendo sido efetuadas 3 lavagens de 5 minutos cada. A coloração com brometo de etídeo na proporção de 1:10 a partir de uma solução de 20µg/mL (BioRad, 161-0433) foi efetuada durante 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água para remover o excesso de corante e observadas num microscópio de fluorescência invertido (Motic AE31) equipado com o sistema de epifluorescência Motic AE31 EF-INV-II. Foi utilizado uma luz de comprimento de onda de excitação de 540/25nm e comprimento de onda de emissão de 605/55nm. As imagens foram adquiridas com recurso a uma câmara Moticom 5000 Cooled acoplada ao computador e ao programa Motic Images Advanced 3.2. Para cada condição foram adquiridas no mínimo fotos de 100 cometas, que foram posteriormente analisadas no programa CometScore (TriTek). O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência dos hAMPE (controlo negativo), na presença de peróxido de hidrogénio (controlo positivo) na concentração de 20nM durante 15 minutos à temperatura de 4°C (Panreac, 121076) e na presença dos hAMPE. O protocolo do ensaio cometa encontra-se ilustrado na figura 3.7.



**Figura 3.7** - Ensaio cometa O ensaio cometa é uma técnica utilizada para determinar danos no ADN. Para tal, as células são embebidas num gel de agarose, lisadas e posteriormente submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. Após utilização de um corante apropriado, é possível observar os danos no ADN através da utilização de um microscópio e posteriormente quantificar os resultados. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## ii. Ensaio de fragmentação com polietileno glicol/Hoechst

O ensaio de fragmentação com PEG/Hoechst baseia-se na lise hipotónica das células e na posterior precipitação seletiva de ADN não fragmentado de elevado peso molecular através da ação do PEG. O ADN fragmentado (20-300kb), que permanece no sobrenadante após centrifugação, pode ser quantificado utilizando o corante fluorescente Hoechst 33258 (Ioannou & Chen 1996).

Para determinar se os hAMPE induziam danos no ADN das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram lisadas devido à ação de uma solução constituída por 0,1% de Triton X-100, 5mM de Trizma base com pH de 8, acertado com ácido clorídrico fumante a 37% e 20mM de EDTA. Posteriormente foram adicionados 2,5% de PEG (Sigma, 1546605) e cloreto de sódio na concentração de 1M e as amostras foram colocadas em gelo durante 10 minutos. Após centrifugação a  $16000 \times G$  durante 10 minutos, aos sobrenadantes adicionou-se na proporção de 1:1 o corante Hoechst 33258 na concentração de  $0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$  em PBS, com pH de 7,4 (Sigma, B1155), preparado imediatamente antes da sua utilização. Após 20 minutos de incubação, a fluorescência foi determinada utilizando para tal uma luz de comprimento de onda de excitação de 360/40nm e o comprimento de onda de emissão de 460/40nm. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

## Ciclo celular

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alterações no ciclo celular das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, recorreu-se à utilização do iodeto de propídeo através da técnica de citometria de fluxo. A utilização de agentes intercalantes, como o iodeto de propídeo, baseia-se no facto de estes se ligarem ao ADN estequiometricamente. Desta forma, é possível conhecer a distribuição das populações celulares nas várias fases do ciclo celular através da quantificação do conteúdo de ADN. Uma vez que o iodeto de propídeo também tem a capacidade de se intercalar no ARN, é necessário utilizar RNase neste ensaio com o objetivo de degradar o ARN e evitar esta ligação (Krishan 1975; Crissman & Steinkamp 1973).

Para determinar se os hAMPE induziam alterações no ciclo celular nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a  $1300 \times G$  durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia anteriormente referida. Posteriormente, as células foram incubadas com  $200 \mu\text{L}$  de etanol gelado a 70% (Sigma, 24102) sob agitação constante e posteriormente incubadas durante 30 minutos à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Após centrifugação a

1300xG durante 5 minutos, adicionaram-se 200µL da solução de iodeto de propídeo/RNase (Immunostep) às células. Após breve homogeneização, as células foram incubadas no escuro durante 15 minutos e posteriormente analisadas no citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) com uma luz de comprimento de onda de excitação de 488nm, tendo sido utilizado o comprimento de onda de emissão de 620nm. Para a análise e a quantificação dos resultados, utilizou-se o programa ModFit LT (Verity Software House). O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE. Os dados obtidos foram analisados em termos da média das intensidades de fluorescência.

### **Proteína 53**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da P53 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína 53 através da técnica de *western blot*.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, a deteção da P53 foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita. Para tal, foi utilizado o anticorpo primário anti-P53 na proporção de 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, sc-47698) e o anticorpo secundário anti-rato na proporção de 1:3000 (GE Healthcare). O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **Proteína 21**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da P21 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína 21 através da técnica de imunofluorescência.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação. Posteriormente, as células foram incubadas durante 15 minutos com 100µL de solução de fixação. Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, adicionaram-se às células 100µL de solução de permeabilização e o anticorpo primário anti-P21 na proporção de 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6246), permanecendo as células a incubar durante 15 minutos no escuro. Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rato conjugado com o fluorocromo PE na proporção de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-3738) durante 20 minutos no escuro. As

células foram novamente sujeitas a lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, posteriormente ressuspensas em 200µL de PBS e a fluorescência finalmente detetada com uma luz com comprimento de onda de emissão 485/20nm e usou-se o comprimento de onda de excitação de 590/35nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **Proteína $\beta$ -catenina**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da proteína  $\beta$ -catenina nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína  $\beta$ -catenina através da técnica de *western blot*.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, a deteção da  $\beta$ -catenina foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita. Para tal, foi utilizado o anticorpo primário anti- $\beta$ -catenina na proporção de 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7963) e o anticorpo secundário anti-rato na proporção de 1:3000 (GE Healthcare). O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **3.4.6 Transportadores de glicose**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão dos GLUT nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à técnica de imunofluorescência.

Para este ensaio,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 24 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia anteriormente referida. Posteriormente, as células foram incubadas com  $3 \mu\text{L}$  de anticorpo anti-GLUT1 conjugado com o fluorocromo PE (R&D Systems, FAB1418P), com  $3 \mu\text{L}$  de anticorpo anti-GLUT2 conjugado com o fluorocromo PE (R&D Systems, FAB1414P), com  $3 \mu\text{L}$  de anticorpo anti-GLUT3 (R&D Systems, MAB1415), com  $3 \mu\text{L}$  de anticorpo anti-GLUT5 (R&D Systems, MAB1349) e com anticorpo anti-GLUT12 na proporção de 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-161659) durante 15 minutos, no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos. Relativamente às células marcadas com os anticorpos anti-GLUT1 e anti-GLUT-2, após a centrifugação foram ressuspensas em 200µL de PBS. Por outro lado, às células marcadas com os anticorpos anti-GLUT3 e anti-GLUT5, adicionou-se o anticorpo secundário anti-rato conjugado com o fluorocromo PE na proporção de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-3738) e às células marcadas com anticorpo anti-GLUT12 adicionou-se o

anticorpo secundário anti-cabra conjugado com o fluorocromo PE na proporção de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-3755). Após 20 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos e ressuspensas em 200µL de PBS. Todas as células foram posteriormente excitadas utilizando para tal uma luz com comprimento de onda de 485/20nm. Para detecção da fluorescência foi utilizado o comprimento de onda de emissão de 590/35nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE.

### **3.4.7 Proteínas de resistência**

#### **Glicoproteína P**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da PGP nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a PGP através da técnica de imunofluorescência.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia anteriormente descrita. Posteriormente, as células foram incubadas com 3µL do anticorpo primário anti-PGP conjugado com o fluorocromo FITC (BD Pharmingen, 557002) durante 15 minutos no escuro. De seguida, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos e ressuspensas em 200µL de PBS. As células foram posteriormente excitadas utilizando para tal uma luz de comprimento de onda de 485/20nm e a detecção da fluorescência foi realizada com o comprimento de onda de emissão de 528/20nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controle) e na presença dos hAMPE.

#### **Proteína de multirresistência 1**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da MRP1 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a MRP1 através da técnica de imunofluorescência.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5

minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo a metodologia anteriormente descrita. Posteriormente, as células foram incubadas com 3µL do anticorpo primário anti-MRP1 conjugado com o fluorocromo FITC (BD Pharmingen, 557593) durante 15 minutos no escuro. De seguida, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos e ressuspensas em 200µL de PBS. As células foram posteriormente excitadas utilizando para tal uma luz de comprimento de onda de 485/20nm e a deteção da fluorescência foi realizada com o comprimento de onda de emissão 528/20nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **Proteína de resistência pulmonar**

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da LRP nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de anticorpos específicos contra a LRP através da técnica de imunofluorescência.

Para tal,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Após este período de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300xG durante 5 minutos e lavadas com PBS por centrifugação segundo o programa anteriormente referido. Posteriormente, as células foram incubadas durante 15 minutos com 100µL de solução de fixação (IntraCell, Immunostep). Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, adicionaram-se às células 100µL de solução de permeabilização e o anticorpo primário anti-LRP na proporção de 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-23916). As células foram incubadas durante 15 minutos no escuro. Após lavagem com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rato conjugado com o fluorocromo PE na proporção de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-3738) durante 20 minutos no escuro. As células foram posteriormente lavadas com PBS por centrifugação a 1300xG durante 5 minutos, ressuspensas em 200µL de PBS e a fluorescência foi posteriormente detetada com o comprimento de onda de emissão de 485/20nm após excitação com uma luz de comprimento de onda de 590/35nm, utilizando para tal um leitor de placas multi-deteção. O ensaio foi realizado com células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos hAMPE.

### **3.4.8 Terapia combinada**

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE quando associados a vários fármacos na atividade metabólica das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 recorreu-se ao ensaio do MTT.

Para tal, foram preparadas suspensões com  $5 \times 10^4$  células/mL que foram posteriormente distribuídas por placas de 96 poços (Corning). Após 24 horas, as células foram incubadas com os hAMPE nas concentrações de  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para as linhas celulares HuH7 e HepG2 e de  $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a linha celular Hep3B2.1-7 em simultâneo com a concentração de cada fármaco necessária para inibir 50% da atividade metabólica celular (IC50). Os valores dos IC50 utilizados neste estudo encontram-se indicados na tabela 3.2 e baseiam-se em valores previamente obtidos pelo grupo de investigação, utilizando as mesmas linhas celulares e os mesmos fármacos (Brito 2014; Brito et al. 2012). Após 72 horas de incubação foi realizado o ensaio de MTT, tal como descrito anteriormente. O ensaio foi simultaneamente realizado com células incubadas na ausência dos hAMPE e dos fármacos, bem como com células incubadas apenas com os hAMPE ou com os fármacos. Nas experiências foram ainda consideradas culturas celulares tratadas com o solvente do fármaco em teste (DMSO no caso do 5-FU e do sorafenib e água no caso da doxorrubicina e da cisplatina).

Tabela 3.2 - IC50 ( $\mu\text{M}$ ) dos fármacos utilizados na terapia combinada

	HuH7	HepG2	Hep3B2.1-7
<b>5-FU</b> (Sigma, F6627)	166,62 $\mu\text{M}$	18,9 $\mu\text{M}$	88,3 $\mu\text{M}$
<b>Doxorrubicina</b> (Sigma, 44583)	0,1 $\mu\text{M}$	0,29 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{M}$
<b>Cisplatina</b> (Sigma, P4394)	1,51 $\mu\text{M}$	2,04 $\mu\text{M}$	2,9 $\mu\text{M}$
<b>Sorafenib</b> (Bayer Healthcare)	9,53 $\mu\text{M}$	4,63 $\mu\text{M}$	4,60 $\mu\text{M}$

### 3.4.9 Estudos *in vivo*

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (projeto aprovado a 25 de Janeiro de 2013 com a referência CHUC-70-12 - anexo A e B), segundo as orientações da Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório (SPCAL), a Diretiva 2010/63/EU e o Decreto-Lei n.º 113/2013 de 7 de Agosto. Foi adotada a política de substituição, de redução e de refinamento (3R). Este estudo foi orientado e executado por investigadores devidamente formados e creditados para o manuseamento de animais de laboratório.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE na terapia do carcinoma hepatocelular *in vivo*, foram realizados estudos utilizando para tal 26 ratinhos machos da estirpe *BALB/c-nude* com idade entre as 6 e as 8 semanas e com massa corporal entre 21 e 29g (figura 3.8). Esta estirpe foi escolhida pois estes animais permitem o rápido desenvolvimento de

xenotransplantes por serem animais atímicos e, portanto, deficientes em células T. Os animais foram adquiridos ao Laboratório Charles River (Espanha), mantidos durante toda a experiência em sala climatizada e sujeitos a ciclos de 12 horas de luz/escuro. Durante toda a experiência foi assegurado o acesso livre a ração estéril e a água filtrada, sendo o bem-estar dos animais avaliado diariamente durante todo o período experimental.



**Figura 3.8** - Ratinho *BALB/c-nude*. Os ratinhos *BALB/c-nude* não possuem timo, sendo por isso imunodeficientes e incapazes de produzir células T. Retirado de [www.scanburresearch.com](http://www.scanburresearch.com) (data de acesso: 3 de Abril de 2016).

## Modelo animal

Com o objetivo de desenvolver modelos animais heterotópicos de carcinoma hepatocelular, foram inoculadas subcutaneamente na região dorsal  $20 \times 10^6$  de células das linhas celulares HuH7 ou HepG2. Esta região anatômica foi selecionada devido à boa vascularização que permite o rápido desenvolvimento tumoral. Por outro lado, a medição do tumor é mais facilmente executada na região dorsal dos ratinhos. Durante todo o processo de monitorização dos ratinhos e do seu xenotransplante foi registada a massa corporal dos ratinhos e o volume tumoral (de acordo com a equação 3.1), bem como qualquer alteração de comportamento e estado geral de saúde dos animais.

$$V = \frac{D \times d^2}{2} \quad (\text{equação 3.1})$$

Nesta equação D corresponde ao diâmetro maior e d ao diâmetro menor do tumor (Dagrosa et al. 2003). As medições foram executadas com uma craveira digital (VWR).

## Terapêutica

Para avaliar o efeito do potencial anti-cancerígeno do hAMPE, os animais foram distribuídos em quatro grupos: o grupo 1, constituído por 7 animais com xenotransplante de células da linha celular HuH7 e que não foram sujeitos a qualquer tratamento (controlo); o

grupo 2, constituído por 7 animais com xenotransplante de células da linha celular HuH7 e que foram sujeitos a terapia com hAMPE; o grupo 3, constituído por 6 animais com xenotransplante de células da linha celular HepG2 e que não foram sujeitos a qualquer tratamento (controlo); e o grupo 4, constituído por 6 animais com xenotransplante de células da linha celular HepG2 e que foram sujeitos a terapia com hAMPE. A terapia com hAMPE foi iniciada quando os tumores atingiram um valor igual ou superior a 300mm<sup>3</sup>. Aos animais dos grupos 2 e 4 foi administrado hAMPE por via intraperitoneal com a concentração de 60mg/kg de dois em dois dias, durante doze dias. Avaliaram-se as dimensões dos tumores de forma a calcular a variação de volume relativamente às dimensões iniciais, segundo a equação 3.2:

$$VTR = \frac{V_x}{V_0} \quad (\text{equação 3.2})$$

Onde  $VTR$  representa o volume tumoral relativo,  $V_x$  representa o volume tumoral obtido em cada dia de avaliação e  $V_0$  representa o volume tumoral obtido aquando do início da terapia (igual ou superior a 300mm<sup>3</sup>). Após os doze dias de terapia, os animais foram ocisados por deslocamento cervical após sobredosagem anestésica, que consistiu numa solução de ketamina a 77% (KetalarR, Porke-Davis) e clorpromazina a 23% (LargactilR, Laboratórios Vitoria) por via subcutânea, e colhidos os tumores para análise histopatológica.

### **Análise histopatológica dos tumores**

A análise histopatológica foi realizada em pelo menos 2 tumores extraídos de animais de cada um dos grupos, tendo os tumores excisados sido colocados em formalina tamponada a 10% constituída por 100mL/L de formaldeído (Sigma, F8775), 4,5g/L de fosfato de sódio monobásico e 3,6g de hidróxido de sódio, com pH de 7,4. Após 24 horas, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (Sigma, 32221), diafanizadas em xilol (VWR, 28975.325) e embutidas em parafina (Sigma, 17310). Posteriormente, secções aleatórias de tecido com 5µm de espessura foram sujeitas a coloração com H&E no aparelho Tissue-Tek Prisma®/Film® (Sakura) segundo o seguinte programa: secagem durante 20 minutos, passagem por xilol durante 15 minutos, passagem por etanol absoluto durante 2 minutos, seguida de nova passagem por etanol a 95% durante 1 minuto. Seguidamente, as secções de tecido foram lavadas com água durante 4 minutos, passadas por hematoxilina (Dill I - Surgipath, Leica) durante 4 minutos, lavadas novamente com água durante 6 minutos, e passadas por eosina (Y/1%, Bio-Optica) durante 1 minuto. Após a ação dos corantes, foram sujeitas a nova lavagem com água durante 15 segundos seguida de passagem por etanol a 95% durante 30 segundos, por etanol absoluto durante 3 minutos e por xilol durante 2 minutos. A observação microscópica foi realizada num microscópio Nikon ACT-1, equipado com câmara

digital Nikon DMXM120F. Foi utilizado um computador dedicado, equipado com o *software* Nikon eclipse 80i.

## 3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS® versão 22 (IBM Corporation). A análise descritiva foi expressa utilizando média  $\pm$  erro padrão para as variáveis quantitativas. Na análise inferencial, a avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas e a homogeneidade das variâncias foi feita de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e de Levene, respetivamente, com o objetivo de determinar a utilização de testes paramétricos ou não paramétricos. No caso do ensaio cometa, a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi realizada recorrendo ao teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste paramétrico t de Student foi usado no caso de se confirmar a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas e a homogeneidade das variâncias. Caso contrário, foi considerado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As comparações entre as linhas celulares foram realizadas com recurso ao teste de análise de variância (ANOVA) de um fator (teste paramétrico), no caso de existir normalidade da distribuição das variáveis e homogeneidade das variâncias, ou ao teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico), em caso contrário. As comparações múltiplas foram realizadas através da correção de Tukey (variâncias homogêneas) ou da correção de Games-Howell (ausência de variâncias homogêneas). Foi considerado um valor de significância de 5 % para todas as comparações.

# Capítulo 4

## Resultados



Através de diversos modelos experimentais e de várias técnicas laboratoriais, que se encontram devidamente descritas no capítulo 3, foi possível obter uma variedade de resultados que nos permitem atualmente conhecer, pelo menos em parte, alguns dos mecanismos de ação através dos quais a membrana amniótica humana atua nas células tumorais e no seu microambiente. Todos os resultados obtidos encontram-se descritos ao longo deste capítulo.

## **4.1 Membrana amniótica humana**

### **4.1.1 Colheita, receção, extração e quantificação das proteínas**

As membranas amnióticas humanas foram obtidas a partir de dadoras submetidas a cesariana eletiva com idade compreendida entre os 17 e os 42 anos ( $31,82 \pm 5,69$  anos; média  $\pm$  desvio padrão). Após a receção e a extração das proteínas das membranas amnióticas humanas, foram obtidos extratos com uma concentração proteica de  $2,91 \pm 1,42$  mg/mL (média  $\pm$  desvio padrão).

## **4.2 Efeito em vários tipos de cancro**

### **4.2.1 Citotoxicidade**

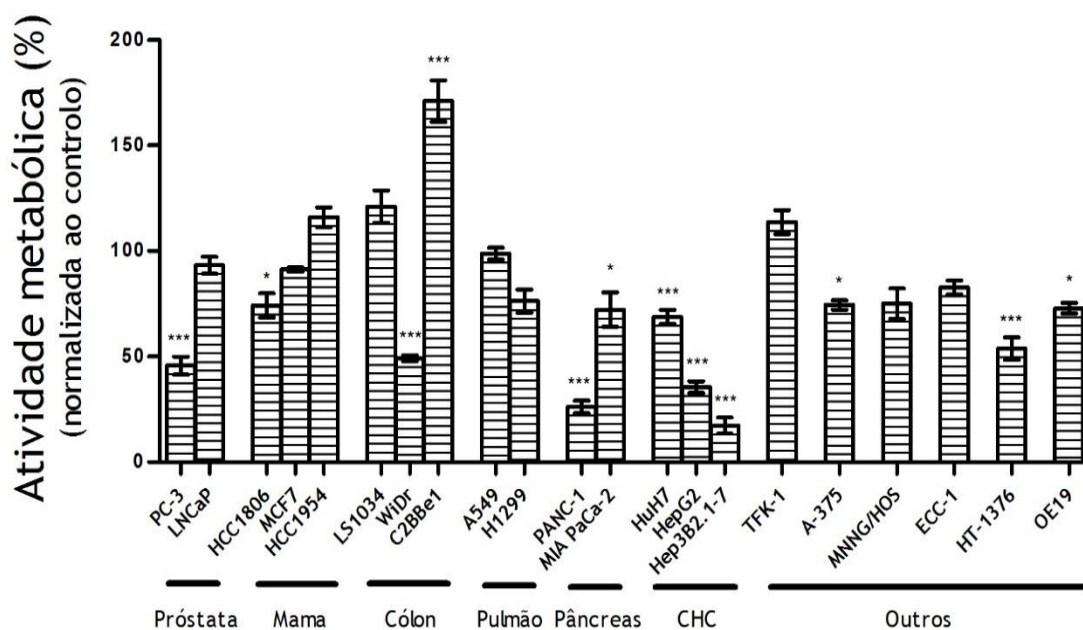
#### **Atividade metabólica**

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE na atividade metabólica de células de várias linhas celulares de cancro humano, recorreu-se ao ensaio do MTT.

A figura 4.1 representa a percentagem de atividade metabólica, normalizada em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), das células das linhas celulares de vários tipos de cancros sólidos. Neste contexto, usámos linhas celulares de cancro da próstata (PC-3, LNCaP), de cancro da mama (HCC1806, MCF7, HCC1954), de cancro do cólon (LS1034, WiDr, C2BBE1), de cancro do pulmão (A549, H1299), de cancro do pâncreas (PANC-1, MIA PaCa-2), de carcinoma hepatocelular (HuH7, HepG2, Hep3B2.1-7), de colangiocarcinoma (TFK-1), de melanoma (A-375), de osteossarcoma (MNNG/HOS), de endométrio (ECC-1), de cancro da bexiga (HT-1376) e de cancro do esófago (OE19) após 72 horas de incubação com  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE.

Os resultados, que se encontram expressos na figura 4.1, revelam que os hAMPE foram capazes de induzir alterações na atividade metabólica das células das diversas linhas

celulares. Como podemos verificar, nas células da linha celular de cancro do cólon C2BBe1 a atividade metabólica aumentou 71% ( $p < 0,001$ ) após o tratamento com os hAMPE. De forma contrária, após condição experimental similar, a atividade metabólica diminuiu 54% nas células da linha celular de cancro da próstata PC-3 ( $p < 0,001$ ), 26% nas células da linha celular de cancro da mama HCC1806 ( $p < 0,05$ ), 51% nas células da linha celular de cancro do cólon WiDr ( $p < 0,001$ ), 28% nas células da linha celular de cancro do pâncreas MIA PaCa-2 ( $p < 0,05$ ), 31% nas células da linha celular de carcinoma hepatocelular HuH7 ( $p < 0,001$ ), 26% nas células da linha celular de melanoma A-375 ( $p < 0,05$ ), 46% nas células da linha celular de cancro da bexiga HT-1376 ( $p < 0,001$ ) e 27% nas células da linha celular de cancro do esófago OE19 ( $p < 0,05$ ). Podemos também verificar que as três linhas celulares cuja atividade metabólica é mais sensível aos hAMPE, com consequentes reduções muito significativas da atividade metabólica, são as células da linha celular do cancro do pâncreas PANC-1, que sofreram uma redução de 74% ( $p < 0,001$ ), e as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular com reduções de 64% ( $p < 0,001$ ) nas células da linha HepG2 e de 83% ( $p < 0,001$ ) nas células da linha Hep3B2.1-7. A atividade metabólica das células de todas as restantes linhas celulares de cancro de origem humana não foi estatisticamente alterada pelo tratamento com os hAMPE.



**Figura 4.1** - Atividade metabólica (%) das células de várias linhas celulares de cancro humano após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com tese post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2014).

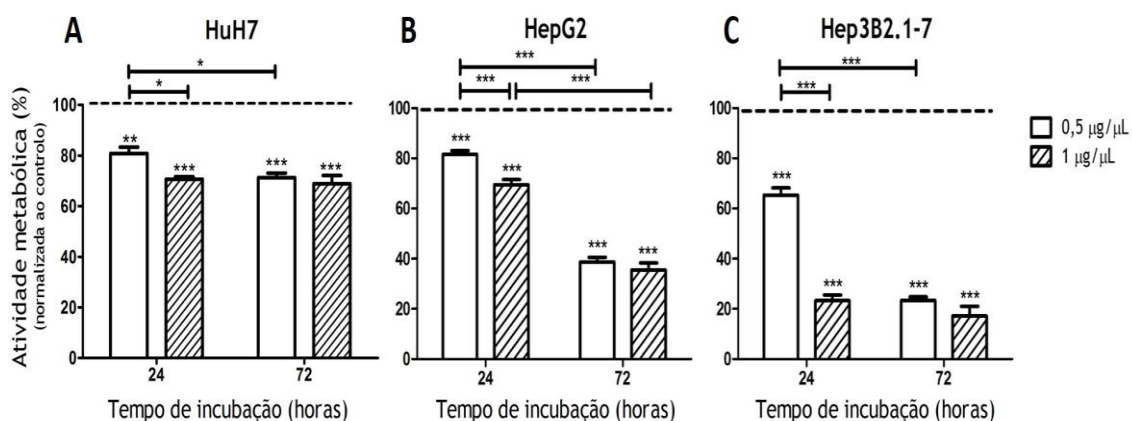
Os resultados evidenciados na figura 4.1 determinaram a escolha do carcinoma hepatocelular como alvo do nosso estudo.

## 4.3 Efeito no carcinoma hepatocelular

### 4.3.1 Citotoxicidade

#### Atividade metabólica

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações e de diferentes tempos de incubação dos hAMPE na atividade metabólica das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, recorreu-se ao ensaio do MTT. A figura 4.2 representa a atividade metabólica, sob a forma de percentagem e normalizada em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 24 horas e 72 horas de incubação com 0,5µg/µL e 1µg/µL de hAMPE.



**Figura 4.2** - Atividade metabólica (%) das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C), após 24 horas e 72 horas de incubação com 0,5µg/µL e com 1µg/µL de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média ± erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell, no caso das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7, ou teste post-hoc Tukey, no caso da linha celular HepG2). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Através da análise da figura 4.2 (A), pode verificar-se uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da atividade metabólica das células da linha celular HuH7 relativamente à condição controlo, após terem sido testadas todas as condições experimentais consideradas neste estudo. Comparando o efeito das duas concentrações de hAMPE testadas (0,5µg/µL e 1µg/µL) com o mesmo período de incubação (24 horas), podemos verificar que a atividade metabólica diminuiu 10% ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. No entanto, após 72 horas

de incubação, não foram registadas diferenças significativas entre a atividade metabólica induzida pelas duas concentrações consideradas. Comparando os dois tempos de incubação (24 horas e 72 horas) em que foi utilizada a concentração 0,5µg/µL de hAMPE, pode verificar-se que a atividade metabólica diminuiu 10% ( $p < 0,05$ ) com o aumento do tempo de incubação. Porém, após incubação com 1µg/µL de hAMPE, não foram registadas diferenças significativas entre a atividade metabólica induzida após os dois períodos de incubação considerados neste estudo.

Quanto às células da linha celular HepG2, podemos verificar, através dos resultados expressos na figura 4.2 (B), uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da atividade metabólica, relativamente à condição controlo, após terem sido testadas todas as condições experimentais consideradas neste estudo. Comparando as duas concentrações de hAMPE (0,5µg/µL e 1µg/µL) para o mesmo tempo de incubação (24 horas), podemos verificar que a atividade metabólica diminuiu 13% ( $p < 0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. No entanto, após 72 horas de incubação, não foram registadas diferenças significativas entre a atividade metabólica induzida pelas duas concentrações consideradas nesta experiência. Comparando os dois tempos de incubação (24 horas e 72 horas) para a mesma concentração (0,5µg/µL), podemos verificar que a atividade metabólica diminuiu 43% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação. Para a concentração de 1µg/µL, verificou-se que o aumento do período de incubação induziu a diminuição de 33% ( $p < 0,001$ ) da atividade metabólica.

Tal como constatado nas outras linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, também podemos verificar através da figura 4.2 (C) uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da atividade metabólica das células da linha celular Hep3B2.1-7, relativamente à condição controlo, após terem sido testadas todas as condições experimentais. Comparando as duas concentrações (0,5µg/µL e 1µg/µL) para o mesmo tempo de incubação (24 horas) podemos verificar que a atividade metabólica diminuiu 42% ( $p < 0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. No entanto, após 72 horas de incubação, não foram registadas diferenças significativas entre a atividade metabólica induzida pelas duas concentrações consideradas neste estudo. Comparando os dois tempos de incubação (24 horas e 72 horas) para a mesma concentração (0,5µg/µL), podemos verificar que a atividade metabólica diminuiu 42% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do tempo de incubação. No entanto, após incubação com 1µg/µL de hAMPE, não foram registadas diferenças significativas entre as atividades metabólicas induzidas pelos dois tempos de incubação considerados.

O efeito dos hAMPE na atividade metabólica das células da linha celular não tumorigénica de fibroblastos HFF1 foi também avaliado através do ensaio do MTT.

Como se pode verificar na tabela 4.1, os hAMPE não alteraram de forma significativa a atividade metabólica das células da linha celular humana não tumorigénica HFF1. Verificou-se que a atividade metabólica das células da linha celular HFF1 foi significativamente maior ( $p < 0,001$ ) do que a das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, considerando o mesmo tempo de incubação (72 horas) e a concentração de hAMPE de 1µg/µL.

**Tabela 4.1** - Atividade metabólica (%) das células das linhas celulares HFF1, HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada linha celular, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os valores representam a média ± erro padrão. As diferenças significativas entre as células da linha celular HFF1 e as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano estão assinaladas por \*, onde \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Tukey). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Linha celular	Atividade metabólica (%)
HFF1	92,21 ± 4,07
HuH7	68,80 ± 3,31 ***
HepG2	35,53 ± 2,73 ***
Hep3B2.1-7	17,24 ± 3,80 ***

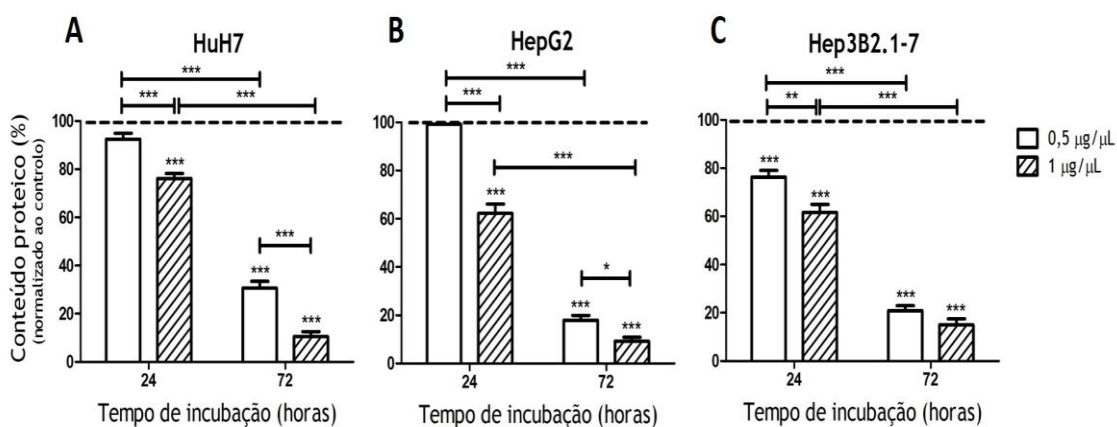
### Conteúdo proteico

Para avaliar o efeito das diferentes concentrações e dos diferentes períodos de incubação com os hAMPE no conteúdo proteico das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, recorreu-se ao ensaio da SRB. A figura 4.3 representa o conteúdo proteico, expresso em percentagem e normalizada em relação ao controlo (células não tratadas com os hAMPE), das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após incubação durante 24 horas e 72 horas com 0,5µg/µL e com 1µg/µL de hAMPE.

De acordo com a figura 4.3 (A), verifica-se uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do conteúdo proteico das células da linha celular HuH7, relativamente à condição controlo, após terem sido ensaiadas todas as condições experimentais consideradas neste estudo, exceto quando estas células são incubadas com 0,5µg/µL de hAMPE durante 24 horas. Comparando o efeito das duas concentrações de hAMPE (0,5µg/µL e 1µg/µL) para o mesmo período de incubação (24 horas), podemos verificar que o conteúdo proteico diminuiu 16% ( $p < 0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. Após 72 horas de incubação, o mesmo comportamento foi observado, verificando-se a redução de 20% ( $p < 0,001$ ) do conteúdo proteico. Comparando os dois períodos de incubação (24 horas e 72 horas) em que foi utilizada a concentração 0,5µg/µL de hAMPE, podemos verificar que o conteúdo proteico diminuiu 62% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação. O mesmo se verifica aquando da incubação das células da linha celular HuH7 com 1µg/µL de hAMPE, tendo o conteúdo proteico sido reduzido 66% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação.

Relativamente à linha celular HepG2, podemos verificar pelos resultados representados na figura 4.3 (B), uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do conteúdo proteico, relativamente

à condição controlo, após terem sido testadas todas as condições experimentais consideradas nesta experiência, exceto quando a incubação foi efetuada com 0,5µg/µL de hAMPE durante 24 horas. Comparando as duas concentrações (0,5µg/µL e 1µg/µL) para o mesmo período de incubação (24 horas), podemos verificar que o conteúdo proteico diminuiu 37% ( $p<0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. Após 72 horas de incubação, o mesmo comportamento foi registado, tendo o conteúdo proteico sido reduzido em 9% ( $p<0,05$ ). Comparando os dois períodos de incubação (24 horas e 72 horas) para a mesma concentração (0,5µg/µL), podemos verificar que o conteúdo proteico diminuiu 81% ( $p<0,001$ ) com o aumento do período de incubação. Considerando a concentração de 1µg/µL, verificou-se que o aumento do período de incubação diminuiu 53% ( $p<0,001$ ) o conteúdo proteico das células da linha celular HepG2.



**Figura 4.3** - Conteúdo proteico (%) das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 24 horas e 72 horas de incubação com 0,5µg/µL e 1µg/µL de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p<0,05$ , \*\* representa  $p<0,01$  e \*\*\* representa  $p<0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell, no caso da linha celular HepG2, ou teste post-hoc Tukey, no caso das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Através dos resultados expressos na figura 4.3 (C), podemos constatar uma diminuição significativa ( $p<0,001$ ) do conteúdo proteico da linha celular Hep3B2.1-7, relativamente à condição controlo, após terem sido ensaiadas todas as condições experimentais. Comparando as duas concentrações (0,5µg/µL e 1µg/µL) para o mesmo período de incubação (24 horas), podemos verificar que o conteúdo proteico diminuiu 15% ( $p<0,01$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. No entanto, após 72 horas de incubação, não foram registadas diferenças significativas entre o conteúdo proteico induzido pelas duas concentrações consideradas neste estudo. Comparando os dois períodos de incubação (24 horas e 72 horas) para a mesma concentração (0,5µg/µL), podemos verificar que o conteúdo proteico diminuiu 55% ( $p<0,001$ ) com o aumento do período de incubação. Considerando a concentração de 1µg/µL, verificou-se que o aumento do período de incubação diminuiu 47% ( $p<0,001$ ) o conteúdo proteico das células da linha celular Hep3B2.1-7.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo proteico das células da linha celular não tumorigénica HFF1, recorreu-se também ao ensaio da SRB.

Como se pode verificar na tabela 4.2, os hAMPE induziram um aumento de 135% ( $p < 0,001$ ) no conteúdo proteico da linha celular HFF1, sendo este valor significativamente maior ( $p < 0,001$ ) do que o conteúdo proteico registado em todas as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano nas mesmas condições experimentais.

**Tabela 4.2** - Conteúdo proteico (%) das células das linhas celulares HFF1, HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada linha celular, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas entre as células da linha celular HFF1 e as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano estão assinaladas por \*, onde \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2015).

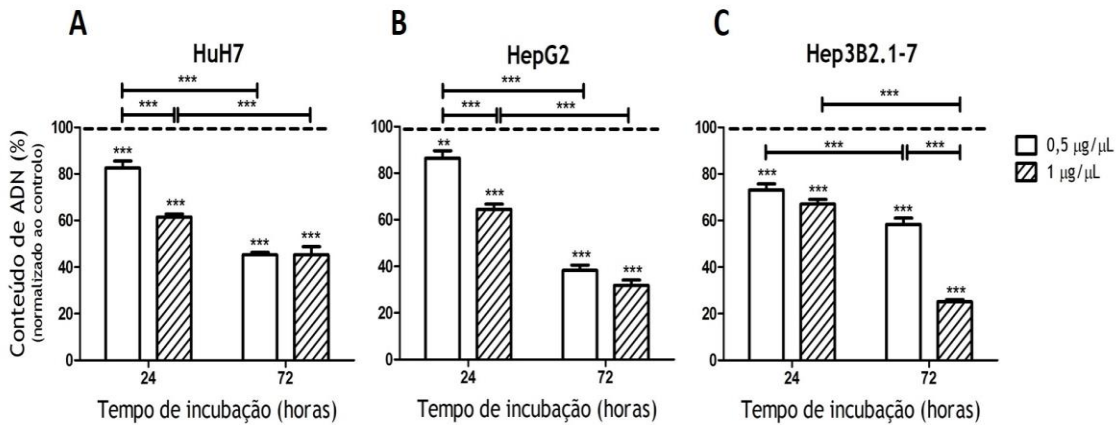
Linha celular	Conteúdo proteico (%)
HFF1	$234,99 \pm 4,56$
HuH7	$10,52 \pm 2,10$ ***
HepG2	$9,33 \pm 1,54$ ***
Hep3B2.1-7	$15,02 \pm 2,52$ ***

### Conteúdo de ácido desoxirribonucleico

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações e de diferentes períodos de incubação com os hAMPE no conteúdo de ADN nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, recorreu-se ao ensaio do violeta de cristal. A figura 4.4 representa o conteúdo de ADN, expresso em percentagem e normalizado em relação ao respetivo controlo constituído por células não tratadas com os hAMPE, das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 24 horas e 72 horas de incubação com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE.

Através dos resultados expressos na figura 4.4 (A), podemos verificar uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do conteúdo de ADN das células da linha celular HuH7, relativamente à condição controlo, após terem sido testadas todas as condições experimentais. Comparando o efeito das duas concentrações ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) após o mesmo período de incubação (24 horas), podemos verificar que o conteúdo de ADN diminuiu 21% ( $p < 0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. No entanto, após 72 horas de incubação, não foram registadas diferenças significativas entre o conteúdo de ADN induzido pelas duas concentrações. Comparando os dois períodos de incubação (24 horas e 72 horas) em que foi utilizada a concentração  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, podemos verificar que o conteúdo de ADN diminuiu 37%

( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação. O mesmo comportamento foi registado aquando da incubação das células da linha celular HuH7 com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, tendo o conteúdo de ADN sido reduzido de 16% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação de 24 para 72 horas.



**Figura 4.4** - Conteúdo de ADN (%) nas células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 24 horas e 72 horas de incubação com  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Tukey). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Quanto às células da linha celular HepG2, podemos verificar, através dos resultados expressos na figura 4.4 (B), uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) do conteúdo de ADN, relativamente à condição controlo, após terem sido testadas todas as condições experimentais consideradas neste estudo. Comparando as duas concentrações ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) para o mesmo período de incubação (24 horas), podemos verificar que o conteúdo de ADN diminuiu 22% ( $p < 0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE. No entanto, após 72 horas de incubação, não foram registadas diferenças significativas entre o conteúdo de ADN induzido pelas duas concentrações consideradas neste estudo. Comparando os dois períodos de incubação (24 horas e 72 horas) para a concentração de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , podemos verificar que o conteúdo de ADN diminuiu 48% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação. Considerando a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , verificou-se que o aumento do período de incubação diminuiu em 33% ( $p < 0,001$ ) o conteúdo de ADN nas células da linha celular HepG2.

Podemos verificar, através dos resultados expressos na figura 4.4 (C), uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do conteúdo de ADN das células linha celular Hep3B2.1-7, relativamente à condição controlo, após terem sido avaliadas todas as condições experimentais. Comparando as duas concentrações de  $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para o período de incubação de 24 horas, podemos verificar que não foram registadas diferenças significativas entre o conteúdo de ADN induzido pelas duas concentrações. No entanto, o conteúdo de ADN diminuiu 33% ( $p < 0,001$ ) com o aumento da concentração de hAMPE

considerando o período de incubação de 72 horas. Comparando os dois períodos de incubação, de 24 horas e de 72 horas, para a concentração de 0,5µg/µL, podemos verificar que o conteúdo de ADN diminuiu 15% ( $p < 0,001$ ) com o aumento do período de incubação. Considerando a concentração de 1µg/µL, verificou-se que o aumento do período de incubação diminuiu em 42% ( $p < 0,001$ ) o conteúdo de ADN.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE no conteúdo de ADN das células da linha celular não tumorigénica HFF1, recorreu-se ao ensaio do violeta de cristal.

O conteúdo de ADN aumentou 54% ( $p < 0,001$ ) nos fibroblastos após tratamento com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. O conteúdo de ADN registado nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano foi estatisticamente inferior ( $p < 0,001$ ) ao registado nas células da linha celular HFF1 nas mesmas condições experimentais, tal como pode ser verificado na tabela 4.3.

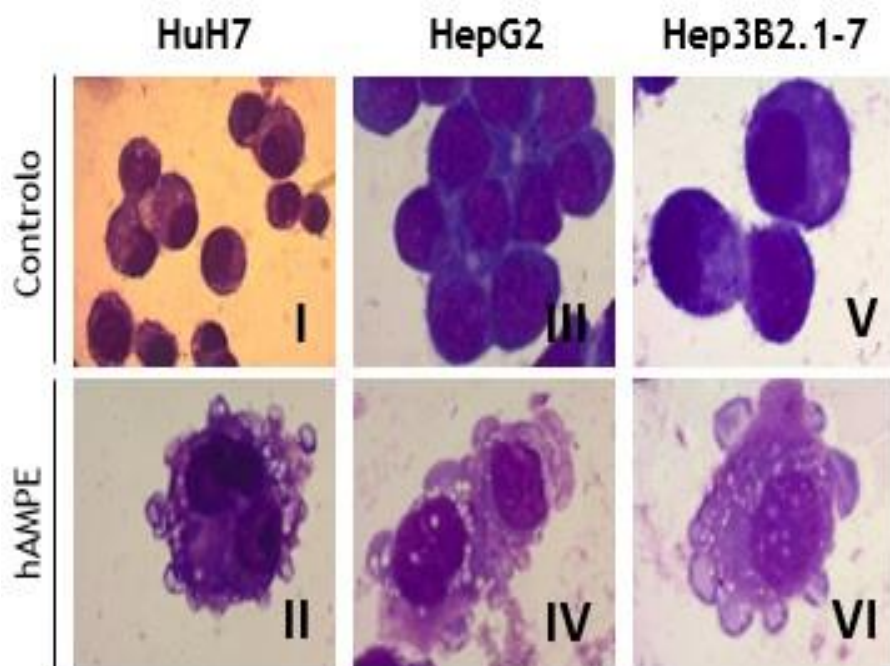
**Tabela 4.3** - Conteúdo de ADN (%) nas células das linhas celulares HFF1, HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada linha celular, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas entre as células da linha celular HFF1 e as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano estão assinaladas por \*, onde \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Tukey). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Linha celular	Conteúdo de ADN (%)
HFF1	153,98 $\pm$ 4,25
HuH7	45,27 $\pm$ 3,50 ***
HepG2	31,87 $\pm$ 2,28 ***
Hep3B2.1-7	25,20 $\pm$ 0,88 ***

### 4.3.2 Viabilidade e morte celular

#### Morfologia

Para estudar o efeito dos hAMPE na viabilidade e na morte das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, recorreu-se à análise morfológica por microscopia ótica após utilização da coloração de May-Grünwald-Giemsa. A figura 4.5 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7 (I e II), HepG2 (III e IV) e Hep3B2.1-7 (V e VI) após 72 horas de incubação na ausência (I, III e V) e na presença de 1µg/µL de hAMPE (II, IV e VI) e posterior coloração de May Grünwald-Giemsa.



**Figura 4.5** - Morfologia das células das linhas celulares HuH7 (I e II), HepG2 (III e IV) e Hep3B2.1-7 (V e VI) após 72 horas de incubação na ausência (I, III e V) e na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE (II, IV e VI). A avaliação morfológica foi realizada após coloração de May-Grünwald-Giemsa. Para cada condição experimental, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. As imagens foram aleatoriamente adquiridas e são representativas de cada condição experimental considerada neste estudo (100x). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Através da figura 4.5 (I) podemos verificar que a população de células da linha celular HuH7 não submetida ao tratamento com os hAMPE (controlo) apresenta uma morfologia compatível com células viáveis. A imagem evidencia um elevado número de agregados celulares com células de diâmetro homogéneo. Após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE podemos verificar, através da figura 4.5 (II), elevada vacuolização celular e formação de projeções citoplasmáticas, alterações que traduzem redução da viabilidade celular.

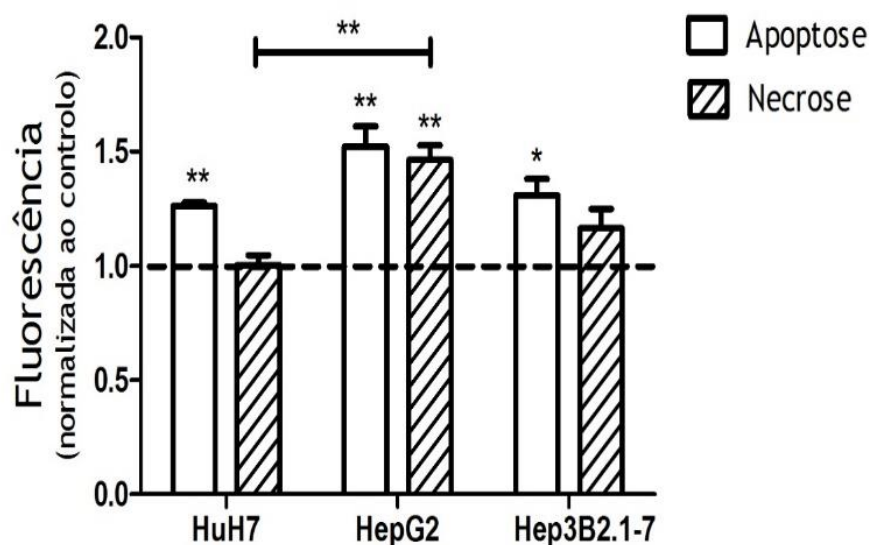
A figura 4.5 (III), relativa à condição controlo das células da linha celular HepG2, revela as células com uma morfologia compatível com células viáveis, isto é, apresentam-se em agregados, com diâmetro homogéneo e núcleo grande. Na figura 4.5 (IV), alusiva ao tratamento das células da linha celular HepG2 durante 72 horas com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, é possível verificar que os hAMPE induziram um aumento da vacuolização celular, bem como um elevado número de projeções citoplasmáticas associadas a rebentamento citoplasmático.

Na figura 4.5 (V), ilustrativa da condição controlo das células da linha celular Hep3B2.1-7, verifica-se que as células apresentam uma elevada viabilidade, com poucos agregados e com elevada heterogeneidade de diâmetro. No que diz respeito ao efeito após incubação das células da linha celular Hep3B2.1-7 durante 72 horas com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, podemos verificar na figura 4.5 (VI) uma elevada vacuolização celular associada a um elevado número de projeções citoplasmáticas.

## Tipos de morte celular

Com a finalidade de determinar se os hAMPE induziam a morte celular por apoptose ou por necrose nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, recorremos à marcação celular com a anexina V e com o iodeto de propídeo. Desta forma, a figura 4.6 representa os resultados obtidos com as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com a anexina V e com o iodeto de propídeo. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.

Podemos constatar na figura 4.6 que o tratamento com os hAMPE induziu um aumento estatisticamente significativo da apoptose, revelada pela marcação com a anexina V, nas células das linhas celulares HuH7 (26%,  $p<0,01$ ), HepG2 (52%,  $p<0,01$ ) e Hep3B2.1-7 (31%,  $p<0,05$ ), relativamente à condição controlo. Quanto à morte celular por necrose, revelada pela marcação com o iodeto de propídeo, o tratamento com os hAMPE apenas induziu um aumento estatisticamente significativo nas células da linha celular HepG2, tendo a necrose aumentado 46% ( $p<0,01$ ) relativamente à condição controlo.



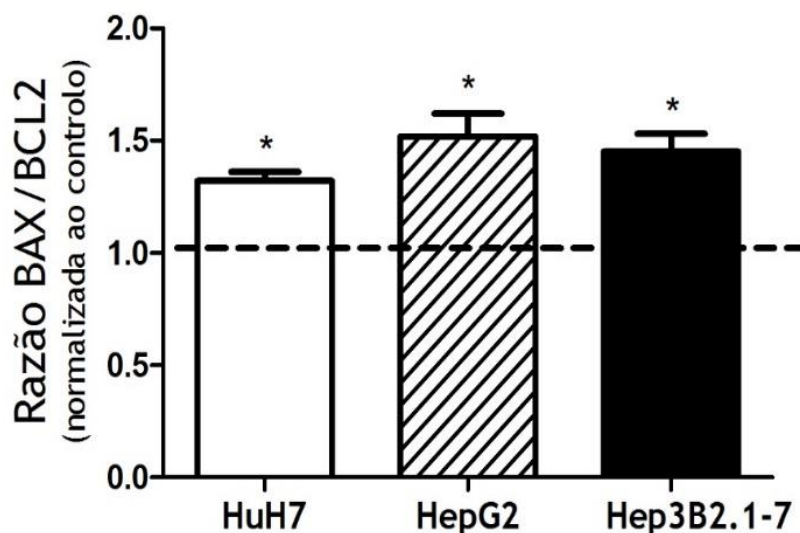
**Figura 4.6** - Apoptose e necrose nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p<0,05$  e \*\* representa  $p<0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2015).

### 4.3.3 Vias de morte celular

#### BAX e BCL2

Para inferir se os hAMPE induziam a alteração na expressão das proteínas BAX e BCL2 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de anticorpos específicos contra as proteínas de interesse através da técnica de imunofluorescência. Desta forma, a figura 4.7 mostra os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com os anticorpos de interesse. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, que consiste em células não tratadas com os hAMPE.

Através dos resultados obtidos, e que se encontram devidamente representados na figura 4.7, podemos verificar que o tratamento com os hAMPE induziu um aumento de 32% ( $p<0,05$ ) na razão BAX/BCL2 nas células da linha celular HuH7 relativamente à condição controlo. O mesmo tratamento induziu um aumento de 52% ( $p<0,05$ ) na razão BAX/BCL2 nas células da linha celular HepG2 e de 45% ( $p<0,05$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7.

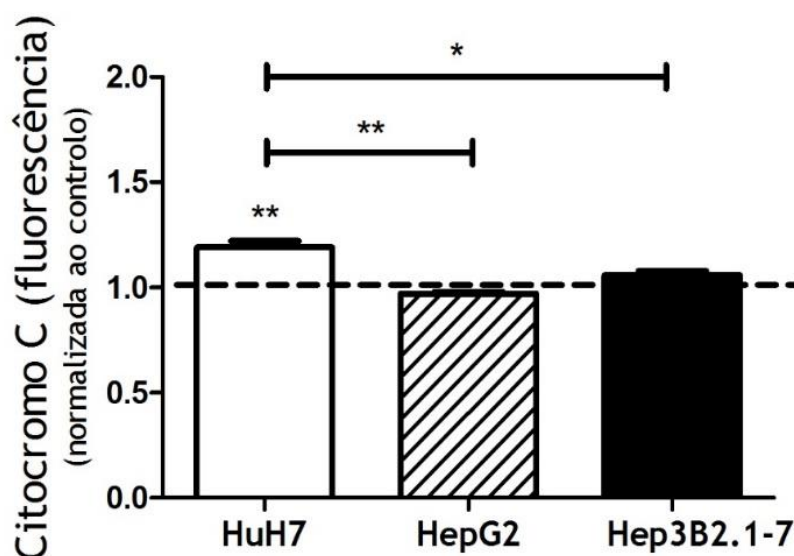


**Figura 4.7** - Razão BAX/BCL2 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p<0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2015).

## Citocromo C

Para determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão do citocromo C nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína de interesse através da técnica de imunofluorescência. Desta forma, a figura 4.8 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. De notar que os resultados se encontram normalizados em relação ao respetivo controlo, que consiste em células não tratadas com os hAMPE.

Através dos resultados apresentados na figura 4.8, podemos verificar que o tratamento com os hAMPE induziu um aumento de 19% ( $p<0,01$ ) na expressão do citocromo C nas células da linha celular HuH7 relativamente à condição controlo. Por outro lado, a expressão do citocromo C nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 não sofreu alterações estatisticamente significativas após o tratamento com os hAMPE.

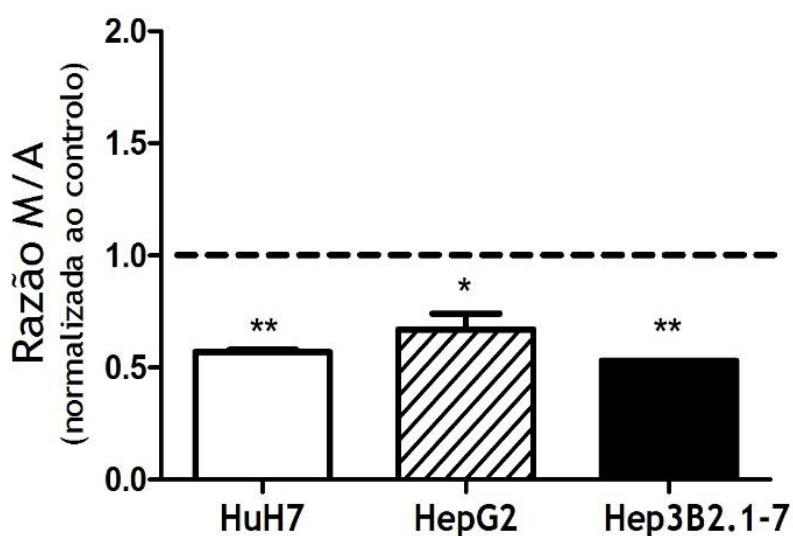


**Figura 4.8** - Expressão do citocromo C nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p<0,05$  e \*\* representa  $p<0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2015).

## Potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar se os hAMPE induziam alteração do PMM nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização do JC-1. A figura 4.9 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o JC-1. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.

O tratamento com os hAMPE induziu o aumento do PMM em todas as linhas celulares em estudo, tal como se pode constatar na figura 4.9. De facto, os hAMPE induziram uma diminuição da razão monómeros/agregados em todas as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, representando este comportamento um aumento do PMM. Nas células da linha celular HuH7, a razão monómeros/agregados diminuiu 43% ( $p<0,01$ ) relativamente à condição controlo. Esta razão também diminuiu 33% ( $p<0,05$ ) nas células da linha celular HepG2 e 47% ( $p<0,01$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7.

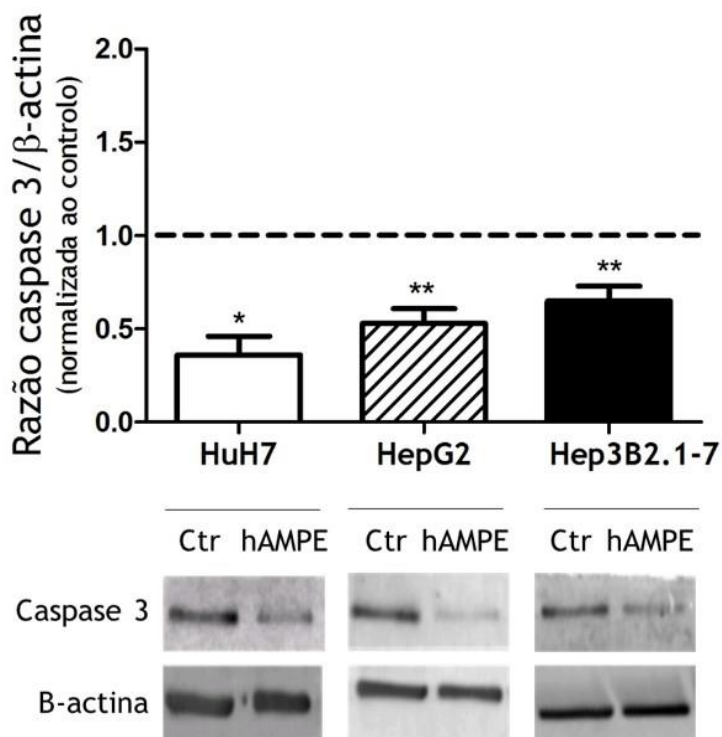


**Figura 4.9** - Razão monómeros/agregados (M/A) nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p<0,05$  e \*\* representa  $p<0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2015).

## Caspases

### Caspase 3

Para determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da caspase 3 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína de interesse através da técnica de *western blot*. Desta forma, a figura 4.10 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. Os resultados apresentados na figura 4.10 encontram-se normalizados em relação ao controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.



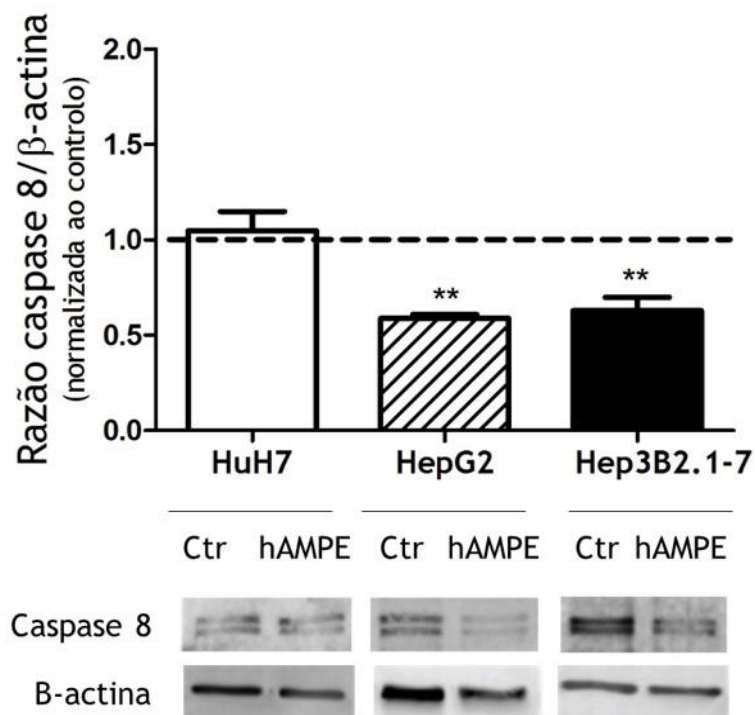
**Figura 4.10** - Expressão da caspase 3 (32kDa) nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência da caspase 3 e da β-actina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1 (razão caspase 3/β-actina igual a 1). Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  e \*\* representa  $p < 0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da caspase 3 e da β-actina. Publicado em (Mamede et al. 2015).

A expressão da caspase 3 diminuiu em todas as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano após o tratamento com os hAMPE, tal como pode ser

constatado na figura 4.10. O tratamento com os hAMPE inibiu 64% ( $p < 0,05$ ) a expressão da caspase 3 nas células da linha celular HuH7 relativamente à condição controlo. A expressão desta proteína também diminuiu 50% ( $p < 0,01$ ) nas células da linha celular HepG2 e 35% ( $p < 0,01$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7.

### Caspase 8

Para avaliar o efeito dos hAMPE na expressão da caspase 8 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína de interesse através da técnica de *western blot*. A figura 4.11 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.

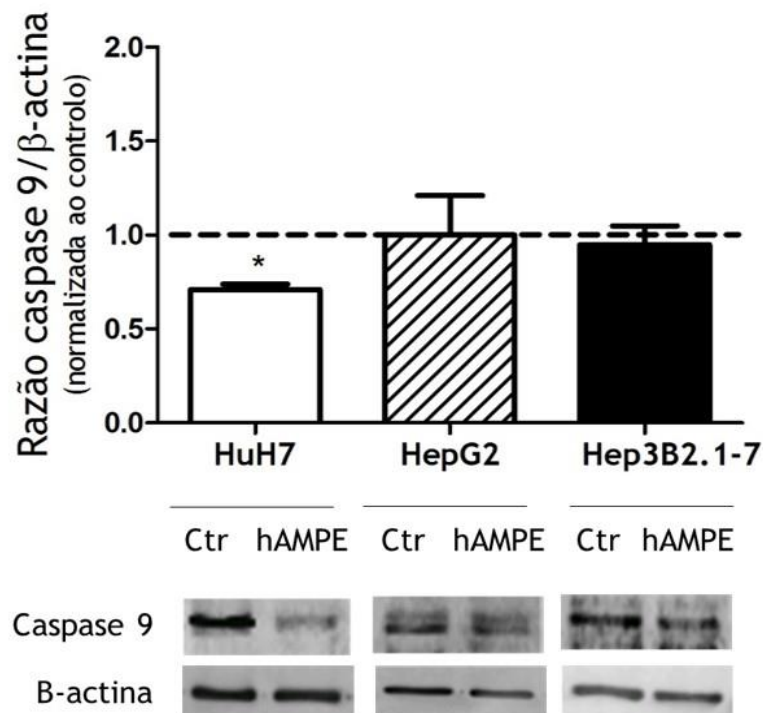


**Figura 4.11** - Expressão da caspase 8 (55kDa) nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência da caspase 8 e da  $\beta$ -actina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1 (razão caspase 8/ $\beta$ -actina igual a 1). Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \*\* representa  $p < 0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da caspase 8 e da  $\beta$ -actina. Publicado em (Mamede et al. 2015).

A expressão da caspase 8 foi inibida em 41% ( $p < 0,01$ ) pelo tratamento com os hAMPE nas células da linha celular HepG2 e em 37% ( $p < 0,01$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7, relativamente à condição controlo, tal como revela a figura 4.11. No entanto, não foram detetadas alterações estatisticamente significativas na expressão da caspase 8 nas células da linha celular HuH7 após as mesmas condições experimentais.

### Caspase 9

Para estudar o efeito dos hAMPE na expressão da caspase 9 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína de interesse através da técnica de *western blot*. Os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse encontram-se ilustrados na figura 4.12. De referir que os resultados se encontram normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.



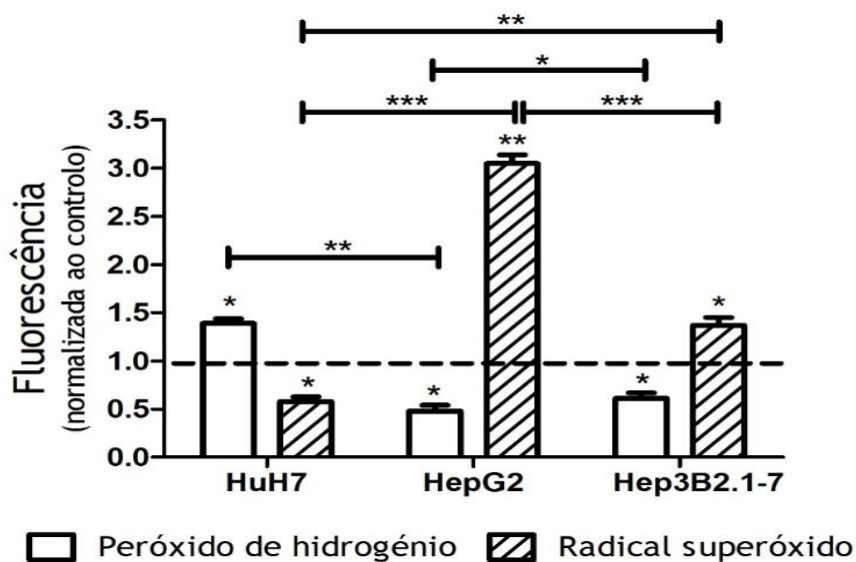
**Figura 4.12** - Expressão da caspase 9 (46kDa) nas células da linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência da caspase 9 e da  $\beta$ -actina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1 (razão caspase 9/ $\beta$ -actina igual a 1). Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da caspase 9 e da  $\beta$ -actina. Publicado em (Mamede et al. 2015).

A expressão da caspase 9 foi inibida em 29% ( $p < 0,05$ ) nas células da linha celular HuH7, relativamente à condição controlo, pelo tratamento com os hAMPE. No entanto, não foram detetadas alterações estatisticamente significativas na expressão da caspase 9 nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 após as mesmas condições experimentais.

#### 4.3.4 Stresse oxidativo e defesas antioxidantes

##### Peróxido de hidrogénio e radical superóxido

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam a alteração da produção do peróxido de hidrogénio e do radical superóxido nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização da DCFH-DA e do DHE, respetivamente. A figura 4.13 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com a DCFH-DA ou com o DHE. Os resultados apresentados na figura 4.13 encontram-se normalizados em relação ao controlo, em que foram consideradas células não tratadas com os hAMPE.



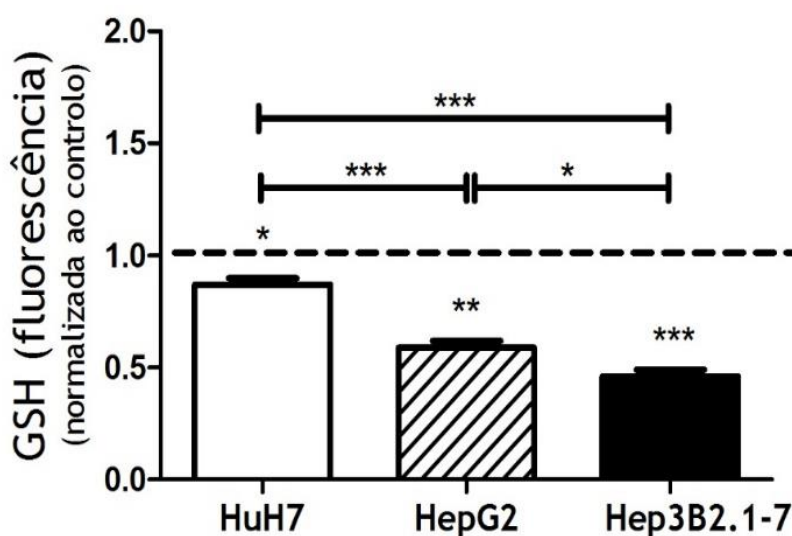
**Figura 4.13** - Produção de peróxido de hidrogénio e de radical superóxido pelas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

O tratamento com os hAMPE induziu um aumento de 39% ( $p < 0,05$ ) na produção do peróxido de hidrogénio nas células da linha celular HuH7 relativamente à condição controlo considerada, tal como pode ser constatado na figura 4.13. Por outro lado, o mesmo tratamento induziu um decréscimo de 52% ( $p < 0,05$ ) na produção do peróxido de hidrogénio nas células da linha celular HepG2 e de 39% ( $p < 0,05$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7.

Considerando o radical superóxido, o tratamento com os hAMPE diminuiu em 42% ( $p < 0,05$ ) a produção desta ROS nas células da linha celular HuH7. Contrariamente, o mesmo tratamento induziu um aumento de 288% ( $p < 0,01$ ) na produção do radical superóxido nas células da linha celular HepG2 e de 37% ( $p < 0,05$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7, tal como pode ser observado na figura 4.13.

## Glutationa

Para determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da GSH nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização do alaranjado de mercúrio. A figura 4.14 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o alaranjado de mercúrio. Todos os resultados se encontram devidamente normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.



**Figura 4.14** - Expressão da GSH nas células da linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Tukey). Publicado em (Mamede et al. 2016).

O tratamento com os hAMPE diminuiu significativamente a expressão da GSH em todas as linhas celulares em estudo relativamente à respetiva condição controlo, tal como se pode confirmar na figura 4.14. O tratamento com os hAMPE reduziu a expressão da GSH em 13% ( $p < 0,05$ ) nas células da linha celular HuH7, em 41% ( $p < 0,01$ ) nas células da linha celular HepG2 e em 54% ( $p < 0,001$ ) nas células da linha celular Hep3B2.1-7.

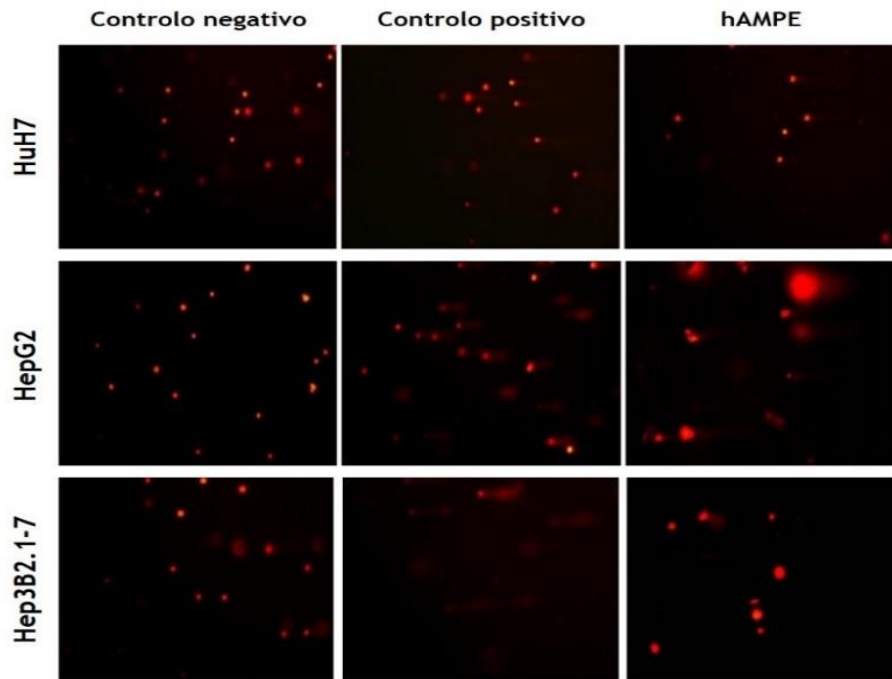
### 4.3.5 Núcleo celular e proteínas reguladoras

#### Danos no ácido desoxirribonucleico

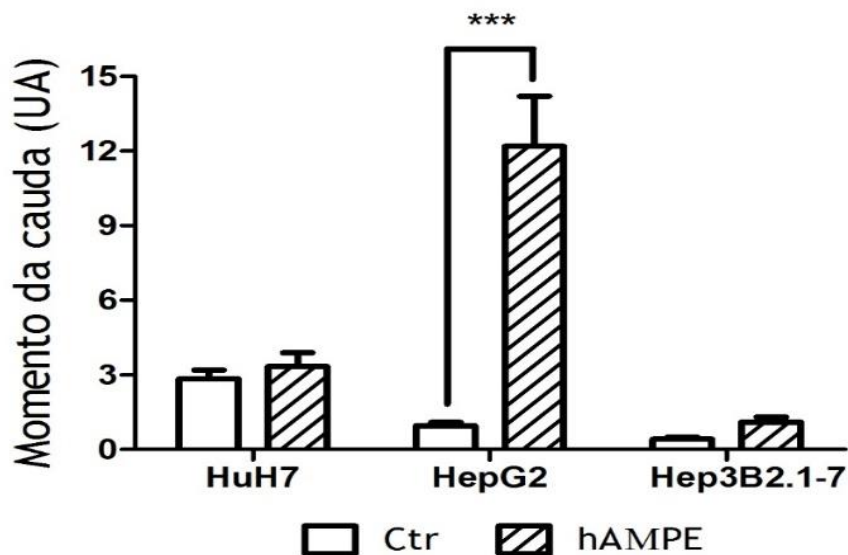
Para avaliar se os hAMPE induziam danos no ADN das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se ao ensaio cometa e ao ensaio de fragmentação com PEG/Hoechst.

##### i. Ensaio cometa

Através da análise das imagens resultantes do ensaio cometa, representadas na figura 4.15, parece não existir danos no ADN das células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7. Este facto é confirmado após o processamento destas mesmas imagens, através do qual se verificou a inexistência de alterações estatisticamente significativas no momento da cauda das células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7, tal como evidenciado na figura 4.16. Relativamente às células da linha celular HepG2, as imagens resultantes do ensaio cometa e apresentadas na figura 4.15, parecem revelar danos no ADN destas células. O cálculo do momento da cauda das células HepG2 confirma o aumento de 13 vezes ( $p < 0,001$ ) após tratamento com os hAMPE relativamente à condição controlo.



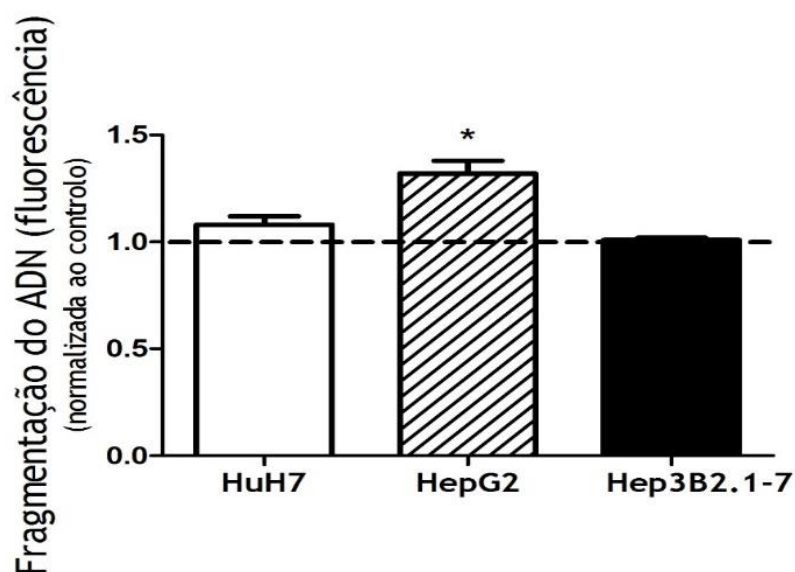
**Figura 4.15** - Integridade do ADN avaliada qualitativamente através do ensaio cometa na linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7. As imagens são representativas das várias condições consideradas no estudo: controlo negativo (células não tratadas com os hAMPE), controlo positivo (células tratadas com 20mM de peróxido de hidrogénio durante 15 minutos a 4°C) e células tratadas com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de 100 cometas e com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. As imagens foram aleatoriamente adquiridas e são representativas de cada condição experimental considerada neste estudo (100x). Publicado em (Mamede et al. 2016).



**Figura 4.16** - Integridade do ADN avaliada quantitativamente através do ensaio cometa na linha celular HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE. Momento da cauda = comprimento da cauda x fração do ADN total na cauda. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de 100 cometas e com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média ± erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \*\*\* representa  $p < 0,001$  (teste de Mann-Whitney). Publicado em (Mamede et al. 2016).

## ii. Ensaio de fragmentação com polietileno glicol/Hoechst

Através dos resultados obtidos através do ensaio de fragmentação com PEG/Hoechst, pode verificar-se que os hAMPE induziram um aumento de 32% ( $p < 0,05$ ) na fragmentação do ADN nas células da linha celular HepG2 relativamente à condição controlo. Não se verificaram alterações estatisticamente significativas na fragmentação do ADN nas células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 após as mesmas condições experimentais, tal como evidenciado na figura 4.17.



**Figura 4.17** - Fragmentação do ADN nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

## Ciclo celular

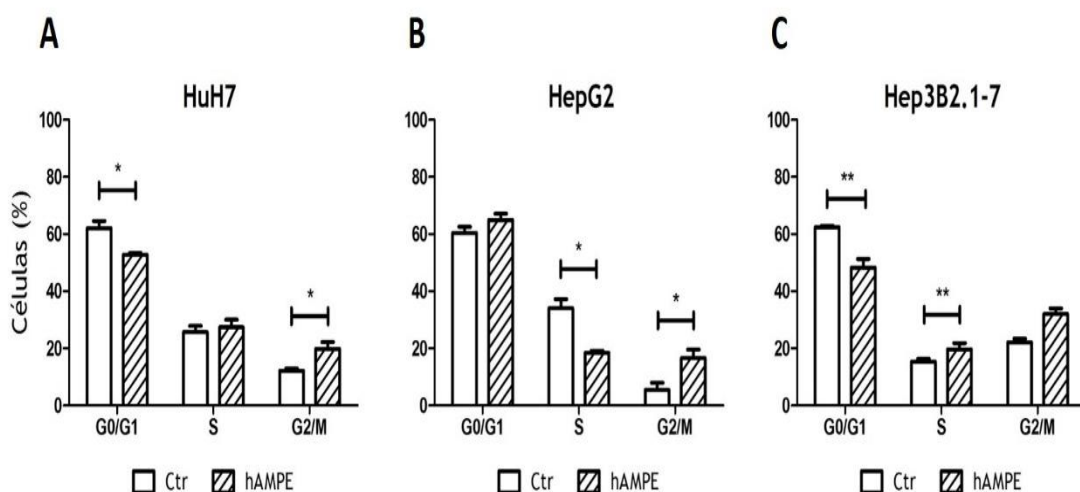
Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alterações no ciclo celular das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização do iodeto de propídeo através da técnica de citometria de fluxo. Desta forma, a figura 4.18 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o iodeto de propídeo.

O tratamento com hAMPE diminuiu em 9% ( $p < 0,05$ ) a percentagem de células da linha celular HuH7 na fase G0/G1 e aumentou em 2% ( $p < 0,05$ ) a percentagem de células na fase G2/M, tal como representado na figura 4.18 (A). Não foram registadas alterações

estatisticamente significativas, relativamente ao controlo, para a percentagem de células da linha celular HuH7 em fase S após tratamento com os hAMPE.

Através da figura 4.18 (B) podemos verificar que a percentagem de células da linha celular HepG2 na fase S diminuiu 17% ( $p < 0,05$ ), enquanto na fase G2/M aumentou 12% ( $p < 0,05$ ) relativamente à condição controlo. Não foram registadas alterações estatisticamente significativas, em relação ao controlo, para a percentagem de células na fase G0/G1 da linha celular HepG2 após tratamento com os hAMPE.

O tratamento com os hAMPE nas células da linha celular Hep3B2.1-7 diminuiu a percentagem de células na fase G0/G1 em 14% ( $p < 0,01$ ) e aumentou em 5% as células na fase S ( $p < 0,01$ ), tal como demonstrado na figura 4.18 (C). Não foram registadas alterações estatisticamente significativas, relativamente ao controlo, da percentagem de células na fase G2/M após tratamento com os hAMPE.



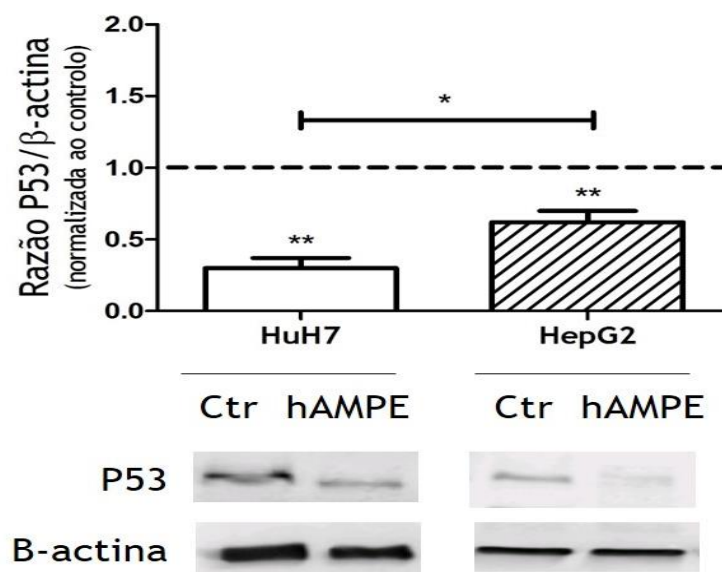
**Figura 4.18** - Análise do ciclo celular das células das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B2.1-7 (C) após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados representam a percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  e \*\* representa  $p < 0,01$  (teste paramétrico t de Student, no caso da linha celular HuH7, ou teste de Mann-Whitney, no caso das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7). Publicado em (Mamede et al. 2016).

## Proteína 53

Para avaliar se os hAMPE induziam alteração da expressão da P53 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7 e HepG2, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína de interesse através da técnica de *western blot*. Estudos realizados pelo nosso grupo de investigação comprovaram que as células da linha celular Hep3B2.1-7 não expressam P53, motivo pelo qual esta linha celular não foi considerada neste ensaio (Brito et al. 2014; Gomes et al. 2015). A figura 4.19 representa os

resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7 e HepG2 após 72 horas de incubação na presença de 1µg/µL de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo dirigido à P53. Os resultados apresentados na figura 4.19 encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células de cada linha celular não tratadas com os hAMPE.

A expressão da P53 foi inibida em 70% ( $p < 0,01$ ) nas células da linha celular HuH7 após o tratamento com os hAMPE, tal como pode ser constatado na figura 4.19. Situação semelhante ocorreu com as células da linha celular HepG2, as quais revelaram uma inibição de 38% ( $p < 0,01$ ) na expressão da P53 relativamente à condição controlo.



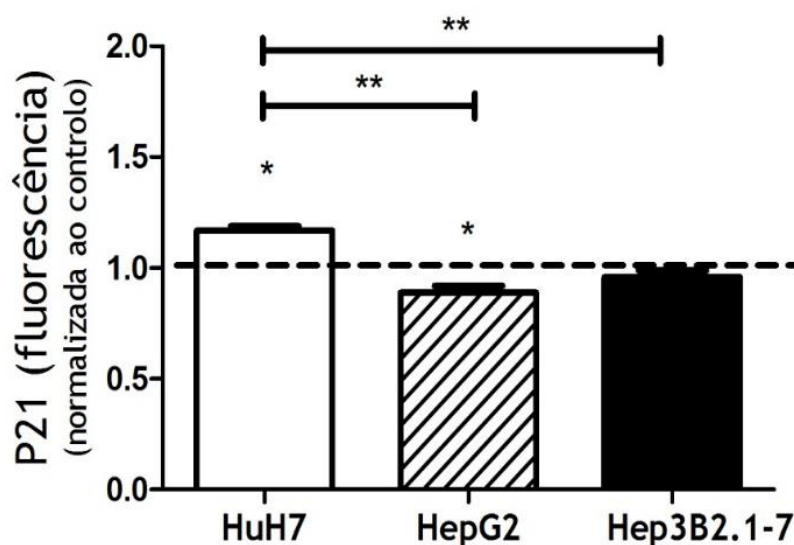
**Figura 4.19** - Expressão da P53 nas células das linhas celulares HuH7 e HepG2 após 72 horas de incubação com 1µg/µL de hAMPE. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência da P53 e da β-actina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1 (razão P53/β-actina igual a 1). Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média ± erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  e \*\* representa  $p < 0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da P53 e da β-actina. Publicado em (Mamede et al. 2016).

## Proteína 21

Para determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da P21 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a P21 através da técnica de imunofluorescência. A figura 4.20 apresenta os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de 1µg/µL de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. Os resultados encontram-

se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células de cada linha celular não tratadas com os hAMPE.

A expressão da P21 aumentou 17% ( $p < 0,05$ ), relativamente à condição controlo, após as células da linha celular HuH7 terem sido tratadas com os hAMPE, tal como representado na figura 4.20. De forma contrária, o mesmo tratamento diminuiu em 11% ( $p < 0,05$ ) a expressão de P21 nas células da linha celular HepG2. O tratamento com os hAMPE não alterou de forma estatisticamente significativa a expressão de P21 nas células da linha celular Hep3B2.1-7, tal como indica a figura 4.20.

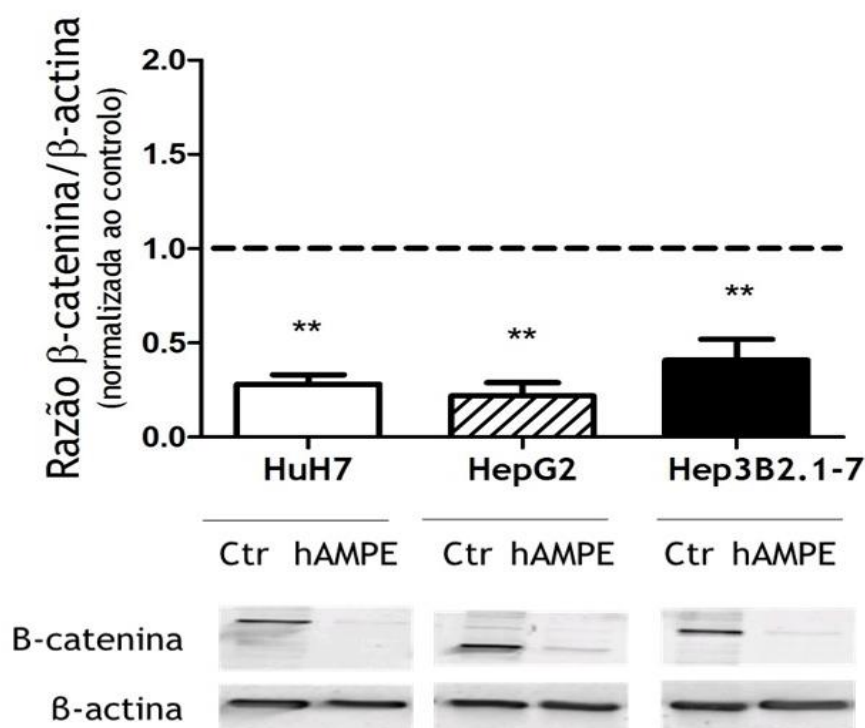


**Figura 4.20** - Expressão da P21 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  e \*\* representa  $p < 0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

### Proteína $\beta$ -catenina

Para inferir se o tratamento com os hAMPE induzia alteração da expressão da  $\beta$ -catenina nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína  $\beta$ -catenina através da técnica de *western blot*. Da figura 4.21 constam os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células de cada linha celular não tratadas com os hAMPE.

O tratamento com os hAMPE diminuiu a expressão da  $\beta$ -catenina em todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular quando comparadas com a respectiva condição controle, tal como se pode confirmar na figura 4.21. Relativamente à linha celular HuH7, a expressão da  $\beta$ -catenina diminuiu 72% ( $p < 0,01$ ) após o tratamento com os hAMPE, enquanto nas células da linha celular HepG2 diminuiu 78% ( $p < 0,01$ ) e nas células da linha celular Hep3B2.1-7 diminuiu 59% ( $p < 0,01$ ).



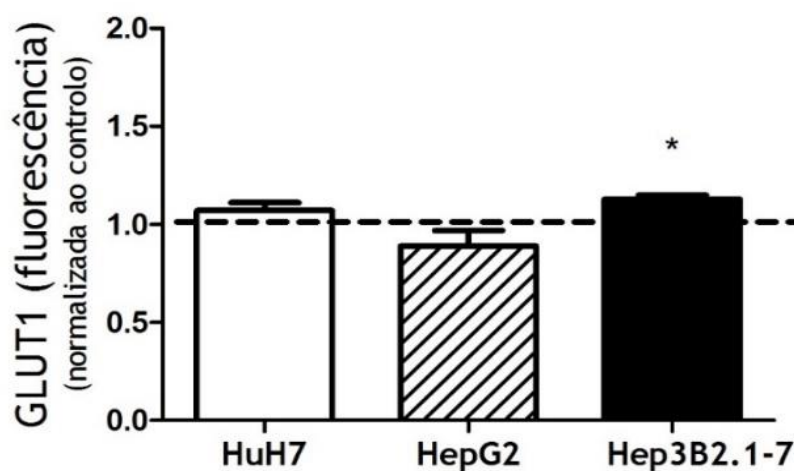
**Figura 4.21** - Expressão da  $\beta$ -catenina nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados são apresentados sob a forma de razão entre a intensidade de fluorescência da  $\beta$ -catenina e da  $\beta$ -actina. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controle (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1 (razão  $\beta$ -catenina/ $\beta$ -actina igual a 1). Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \*\* representa  $p < 0,01$ . As imagens constituem um *immunoblot* ilustrativo da expressão da  $\beta$ -catenina e da  $\beta$ -actina (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

#### 4.3.6 Transportadores de glicose

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão dos GLUT nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de anticorpos específicos contra os GLUT através da técnica de imunofluorescência. As figuras 4.22, 4.23, 4.24, 4.25 e 4.26, que dizem respeito à expressão de GLUT1, de GLUT2, de GLUT3, de GLUT5 e de GLUT12, representam os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72

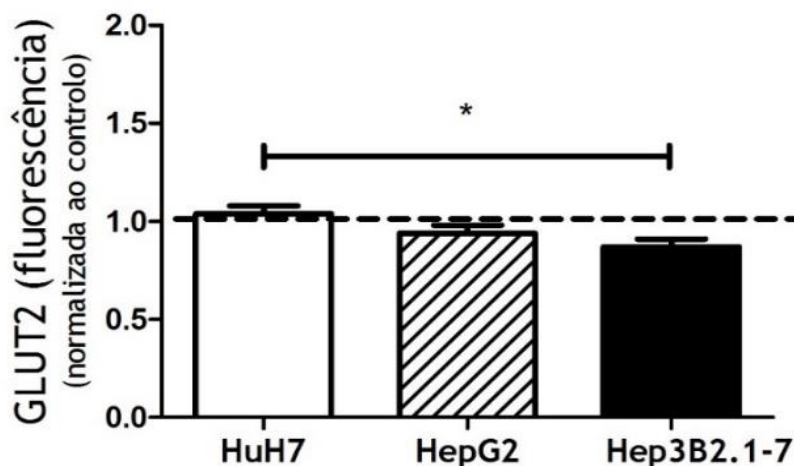
horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com os anticorpos referidos. Todos os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo, ou seja, células de cada linha celular não tratadas com os hAMPE.

Na figura 4.22 podemos observar que o tratamento com os hAMPE aumentou em 13% ( $p < 0,05$ ) a expressão do GLUT1 nas células da linha celular Hep3B2.1-7 relativamente à condição controlo. Por outro lado, o mesmo tratamento não foi capaz de induzir alterações estatisticamente significativas na expressão do GLUT1 nas células das linhas celulares HuH7 e HepG2.



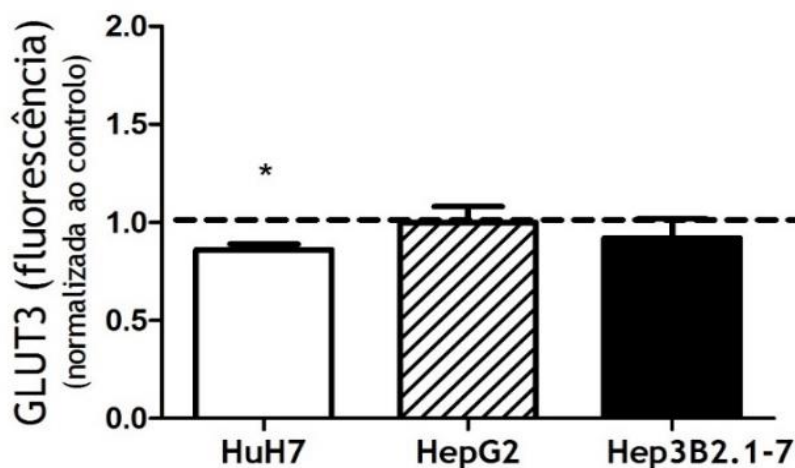
**Figura 4.22** - Expressão do GLUT1 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

Relativamente à expressão do GLUT2, o tratamento com os hAMPE não induziu alterações estatisticamente significativas em nenhuma das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano em estudo comparativamente à condição controlo, tal como se pode constatar na figura 4.23.



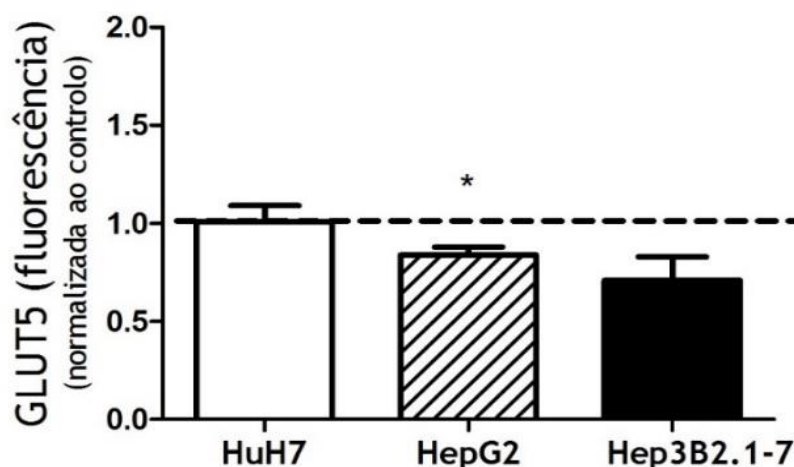
**Figura 4.23** - Expressão do GLUT2 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

O tratamento com os hAMPE diminuiu em 14% ( $p < 0,05$ ) a expressão do GLUT3 nas células da linha celular HuH7 relativamente à condição controlo. No entanto, as mesmas condições experimentais foram incapazes de alterar a expressão do mesmo transportador nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7, tal como se pode observar na figura 4.24.



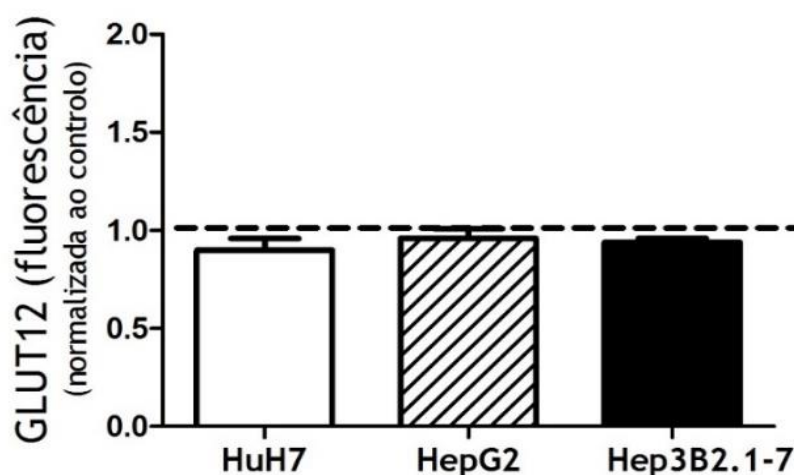
**Figura 4.24** - Expressão do GLUT3 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

A expressão de GLUT5 foi inibida em 16% ( $p < 0,05$ ) nas células da linha celular HepG2 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE, tal como se pode verificar na figura 4.25. No entanto, o mesmo tratamento não induziu alterações estatisticamente significativas na expressão do GLUT5 nas células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7.



**Figura 4.25** - Expressão do GLUT5 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

O tratamento com os hAMPE não induziu alterações estatisticamente significativas na expressão do GLUT12 em nenhuma das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, tal como pode ser observado na figura 4.26.



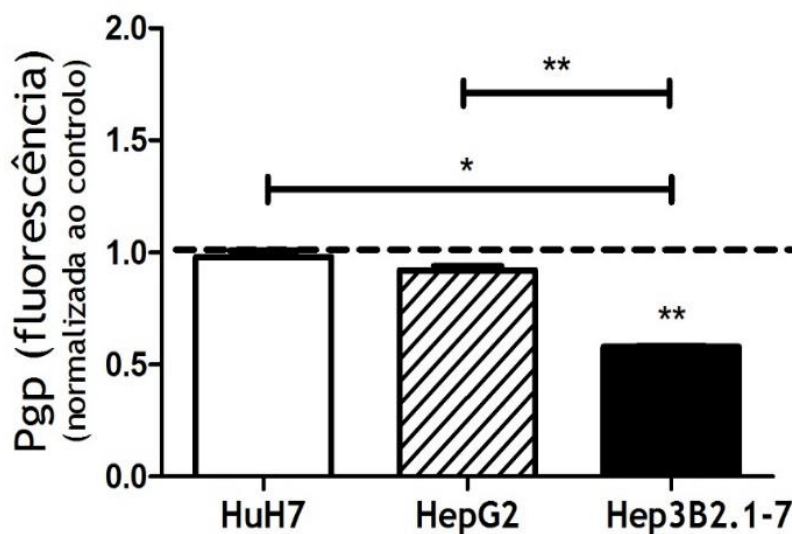
**Figura 4.26** - Expressão do GLUT12 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

### 4.3.7 Proteínas de resistência

#### Glicoproteína P

Para avaliar o efeito dos hAMPE na expressão da PGP nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a PGP através da técnica de imunofluorescência. A figura 4.27 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. Todos os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células não tratadas com os hAMPE.

O tratamento com o hAMPE diminuiu em 42% ( $p<0,01$ ) a expressão da PGP nas células da linha celular Hep3B2.1-7 relativamente à condição controlo definida para esta experiência. O mesmo tratamento não induziu alterações estatisticamente significativas na expressão da PGP nas células das outras linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano.

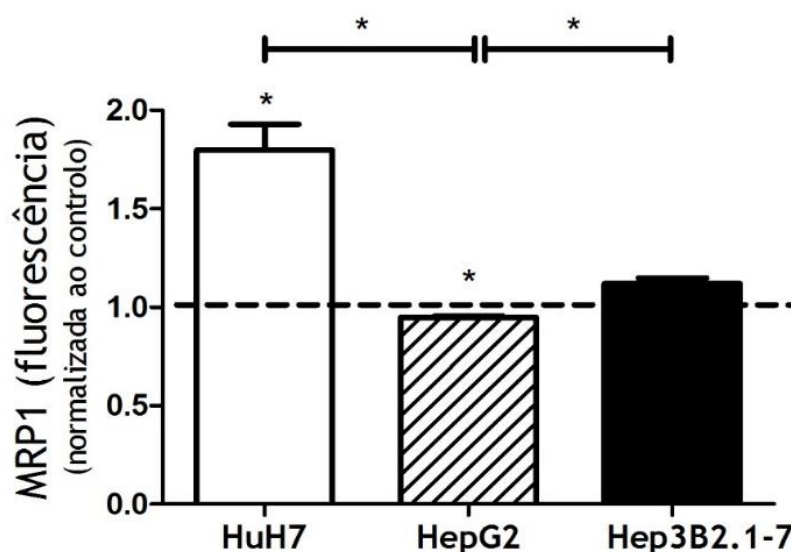


**Figura 4.27** - Expressão da PGP nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p<0,05$  e \*\* representa  $p<0,01$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

## Proteína de multirresistência 1

Para determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da MRP1 nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a proteína MRP1 através da técnica de imunofluorescência. A figura 4.28 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células de cada linha celular não tratadas com os hAMPE.

Através da figura 4.28 podemos confirmar que o tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas induziu um aumento estatisticamente significativo de 80% ( $p < 0,05$ ) na expressão de MRP1 nas células da linha celular HuH7. De forma contrária, o mesmo tratamento induziu uma redução de 5% ( $p < 0,05$ ) na expressão de MRP1 nas células da linha celular HepG2 relativamente à condição controlo. A expressão de MRP1 não sofreu alterações estatisticamente significativas nas células da linha celular Hep3B2.1-7 após o tratamento com os hAMPE.

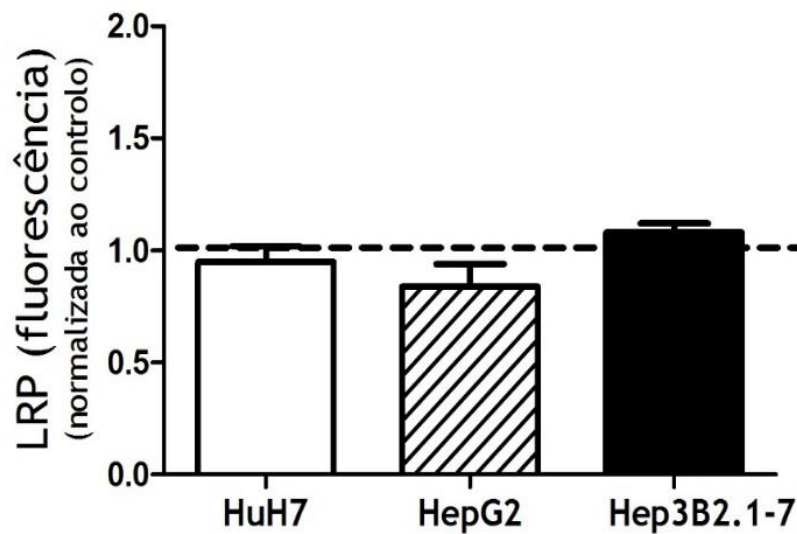


**Figura 4.28** - Expressão da MRP1 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas estão assinaladas por \*, onde \* representa  $p < 0,05$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

## Proteína de resistência pulmonar

Com o objetivo de determinar se os hAMPE induziam alteração da expressão da LRP nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se à utilização de um anticorpo específico contra a LRP através da técnica de imunofluorescência. A figura 4.29 representa os resultados obtidos para as células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação na presença de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e posterior marcação celular com o anticorpo de interesse. De referir que os resultados apresentados se encontram normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células de cada linha celular não tratadas com os hAMPE.

Como se pode constatar na figura 4.29, relativa à expressão da LRP nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, a expressão desta proteína não sofreu alterações estatisticamente significativas após o tratamento com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE durante 72 horas em nenhuma das linhas celulares em estudo.



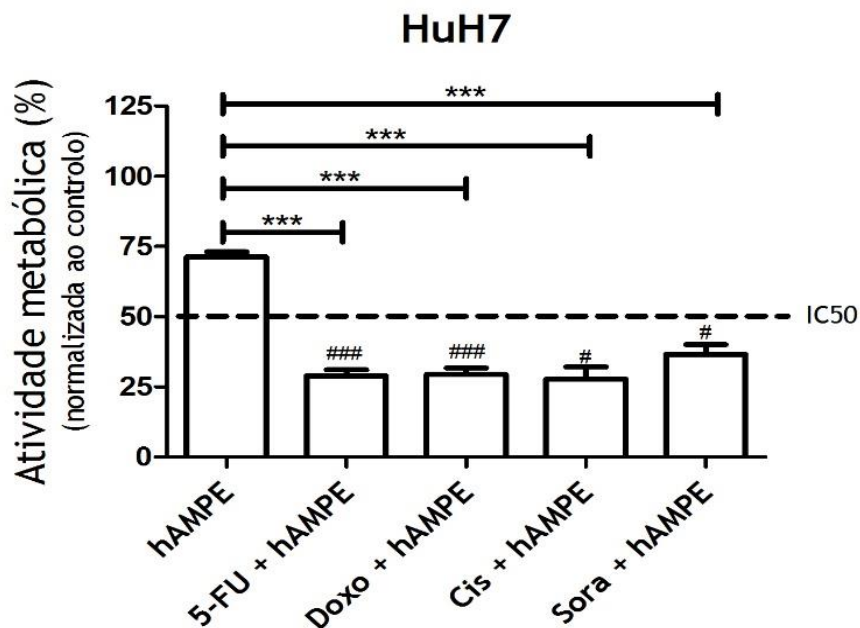
**Figura 4.29** - Expressão da LRP1 nas células das linhas celulares HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7 após 72 horas de incubação com  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE. Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com os hAMPE), ao qual foi atribuído o valor de 1. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de três membranas amnióticas humanas. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell). Publicado em (Mamede et al. 2016).

### 4.3.8 Terapia combinada

Para determinar o efeito dos hAMPE, quando associados a outros fármacos, na atividade metabólica das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano HuH7, HepG2 e Hep3B2.1-7, recorreu-se ao ensaio do MTT. A figura 4.30 representa a atividade metabólica das células da linha celular HuH7, a figura 4.31 a atividade metabólica das células da linha celular HepG2 e a figura 4.32 a atividade metabólica das células da linha celular Hep3B2.1-7, após 72 horas de terapia combinada. Os resultados apresentados encontram-se normalizados em relação ao respetivo controlo, constituído por células de cada linha celular não tratadas com hAMPE ou com qualquer dos fármacos.

Os resultados obtidos com as células da linha celular HuH7 encontram-se descritos na figura 4.30. A comparação da terapia combinada, evidenciada nas últimas quatro colunas do gráfico 4.30, com a monoterapia com os hAMPE, evidenciada na primeira coluna do gráfico 4.30, mostra que existe uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) da atividade metabólica após todas as combinações entre os fármacos e os hAMPE terem sido testadas relativamente à monoterapia com os hAMPE. Obteve-se uma redução na atividade metabólica de 42% para a combinação dos hAMPE com o 5-Fluorouracilo (segunda coluna do gráfico 4.30), de 42% para a combinação com a doxorrubicina (terceira coluna do gráfico 4.30), de 43% para a combinação com a cisplatina (quarta coluna do gráfico 4.30) e de 34% para a combinação com o sorafenib (quinta coluna do gráfico 4.30) em relação à monoterapia com os hAMPE (primeira coluna do gráfico 4.30).

A comparação dos resultados das terapias combinadas, evidenciadas nas últimas quatro colunas do gráfico 4.30, com o IC50 obtido em monoterapia com os fármacos utilizados, graficamente representado pela linha a tracejado evidenciada no gráfico 4.30 (50%), mostra um decréscimo da atividade metabólica com significância estatística para todas as combinações dos fármacos com os hAMPE em relação à monoterapia com o respetivo fármaco. A terapia combinada dos hAMPE com o 5-FU diminuiu a atividade metabólica de 50% (IC50 de cada fármaco) para 29% ( $p < 0,001$ ). Existe também um decréscimo estatisticamente significativo da atividade metabólica entre a terapia combinada dos hAMPE com a doxorrubicina (21%,  $p < 0,001$ ) e com a cisplatina (22%,  $p < 0,05$ ) em relação à monoterapia com o IC50 de cada um dos fármacos, representado pela linha a tracejado (50%). A combinação dos hAMPE com o IC50 do sorafenib diminuiu em 13% a atividade metabólica comparativamente à monoterapia com o mesmo fármaco ( $p < 0,05$ ).

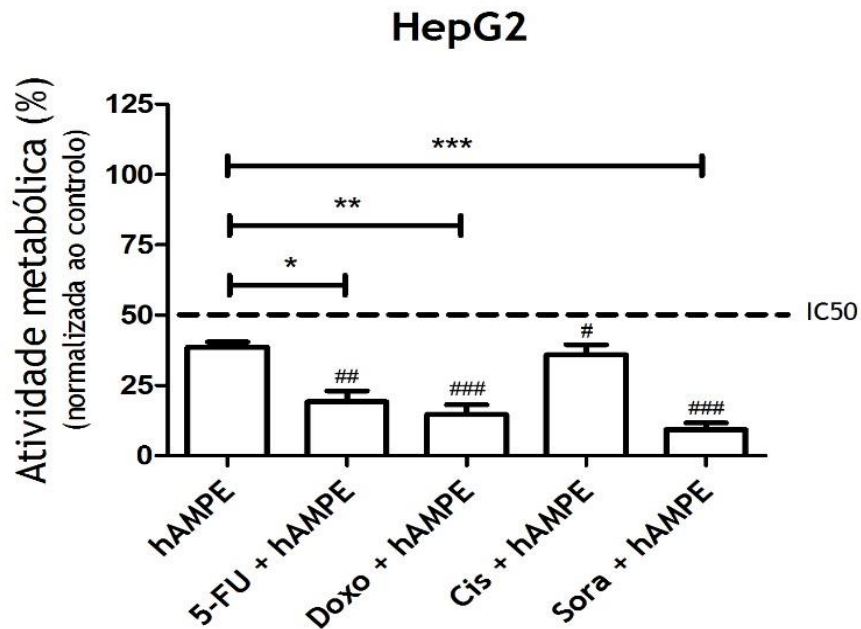


**Figura 4.30** - Atividade metabólica (%) das células da linha celular HuH7 após 72 horas de terapia combinada com 0,5µg/µL de hAMPE e com 166,62µM de 5-FU, ou com 0,1µM de doxorubicina (Doxo), ou com 1,51µM de cisplatina (Cis) ou com 9,53µM de sorafenib (Sora). A primeira coluna do gráfico representa a percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com os hAMPE. A linha a tracejado representa a percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com o IC50 dos fármacos (50%). Os IC50 foram calculados através de ajuste sigmoidal (função de Boltzmann) e publicados em (Brito et al. 2012) e (Brito et al. 2016). Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com hAMPE ou fármacos), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média ± erro padrão. As diferenças significativas assinaladas por \* são relativas à comparação entre a monoterapia com hAMPE e a terapia combinada. Por outro lado, as diferenças significativas assinaladas por # são relativas à comparação entre a monoterapia com os fármacos e a terapia combinada. As diferenças significativas estão assinaladas por \* ou #, onde \* e # representam  $p < 0,05$  e \*\*\* ou ### representam  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

Relativamente às células da linha celular HepG2, verifica-se que a terapia combinada, evidenciada nas últimas quatro colunas do gráfico 4.31, em relação à monoterapia com os hAMPE, representada na primeira coluna do gráfico 4.31, induz um decréscimo significativo da atividade metabólica para todas as associações testadas, à exceção da combinação com a cisplatina (quarta coluna do gráfico 4.31), relativamente à monoterapia com os hAMPE. Assim, a terapia combinada dos hAMPE com o 5-FU (segunda coluna do gráfico 4.31) induziu uma diminuição significativa da atividade metabólica de 20% ( $p < 0,05$ ) nas células da linha celular HepG2 em relação à monoterapia com os hAMPE. A combinação dos hAMPE com a doxorubicina (terceira coluna do gráfico 4.30) induziu uma diminuição de 24% ( $p < 0,01$ ) na atividade metabólica celular em relação à monoterapia com os hAMPE. Por último, a incubação simultânea dos hAMPE com o sorafenib induziu uma diminuição de 30% ( $p < 0,001$ ) na atividade metabólica comparativamente ao valor obtido para a terapia com recurso apenas aos hAMPE, tal como revelado na primeira coluna do gráfico 4.31.

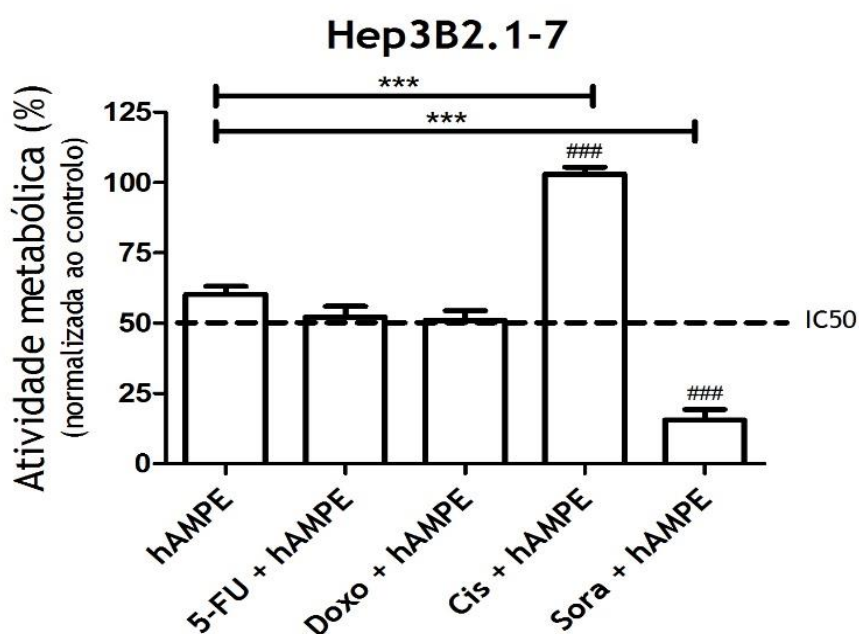
A comparação dos resultados obtidos com as terapias combinadas, evidenciada nas últimas quatro colunas do gráfico 4.31, com o IC50 obtido em monoterapia com os fármacos

utilizados, graficamente representado pela linha a tracejado evidenciada no mesmo gráfico (50%), mostra que existe um decréscimo com significado estatístico para todas as associações em relação à monoterapia com o respetivo fármaco. Relativamente à monoterapia com o IC50 do 5-FU, a terapia combinada dos hAMPE com o 5-FU diminuiu a atividade metabólica em 31% ( $p < 0,01$ ) nas células da linha celular HepG2. A combinação dos hAMPE com a doxorrubicina, bem como com a cisplatina, induziu um decréscimo com significância estatística de 35% ( $p < 0,001$ ) e de 14% ( $p < 0,05$ ), respetivamente, em relação à percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com o IC50 de cada um dos fármacos (50%). Relativamente à terapia combinada dos hAMPE com o sorafenib, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa na atividade metabólica de 41% ( $p < 0,001$ ) relativamente à monoterapia com o IC50 do fármaco.



**Figura 4.31** - Atividade metabólica (%) das células linha celular HepG2 após 72 horas de terapia combinada com 0,5µg/µL de hAMPE e com 18,9µM de 5-FU, ou com 0,29µM de doxorrubicina (Doxo), ou com 2,04µM de cisplatina (Cis) ou com 4,63µM de sorafenib (Sora). A primeira coluna do gráfico representa a percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com os hAMPE. A linha a tracejado representa a percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com o IC50 dos fármacos (50%). Os IC50 foram calculados através de ajuste sigmoidal (função de Boltzmann) e publicados em (Brito et al. 2012) e (Brito et al. 2016). Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com hAMPE ou fármacos), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média ± erro padrão. As diferenças significativas assinaladas por \* são relativas à comparação entre a monoterapia com hAMPE e a terapia combinada. Por outro lado, as diferenças significativas assinaladas por # são relativas à comparação entre a monoterapia com os fármacos e a terapia combinada. As diferenças significativas estão assinaladas por \* ou #, onde \* e # representam  $p < 0,05$  e \*\*\* ou ### representam  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Games-Howell).

Observando os resultados expressos na figura 4.32, relativos à linha celular Hep3B2.1-7, e comparando a atividade metabólica da terapia combinada, evidenciada nas últimas quatro colunas do gráfico 4.32, com a monoterapia com os hAMPE, representada na primeira coluna do mesmo gráfico, verificou-se que existe um decréscimo significativo da atividade metabólica de 44% ( $p < 0,001$ ) após terapia combinada dos hAMPE com o sorafenib em relação à monoterapia com os hAMPE. Contrariamente, verificou-se um aumento de 43% ( $p < 0,001$ ) após combinação dos hAMPE com a cisplatina em relação à monoterapia com os hAMPE, tal como evidenciado na quarta coluna do gráfico 4.32. Em relação à incubação dos hAMPE em associação com os outros fármacos, não se verificaram alterações estatisticamente significativas em comparação com a monoterapia com os hAMPE.



**Figura 4.32** - Atividade metabólica (%) da linha celular Hep3B2.1-7 após 72 horas de terapia combinada com  $0,1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de hAMPE e com  $88,3\mu\text{M}$  de 5-FU, ou com  $0,4\mu\text{M}$  de doxorrubicina (Doxo), ou com  $2,9\mu\text{M}$  de cisplatina (Cis) ou com  $4,60\mu\text{M}$  de sorafenib (Sora). A primeira coluna do gráfico representa a percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com os hAMPE. A linha a tracejado representa a percentagem de atividade metabólica induzida pela monoterapia com o IC50 dos fármacos (50%). Os IC50 foram calculados através de ajuste sigmoidal (função de Boltzmann) e publicados em (Brito et al. 2012) e (Brito et al. 2016). Os resultados estão normalizados em relação ao respetivo controlo (células não tratadas com hAMPE ou fármacos), ao qual foi atribuído o valor de 100%. Para cada condição, os resultados foram obtidos com o mínimo de quatro membranas amnióticas humanas e oito experiências. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas assinaladas por \* são relativas à comparação entre a monoterapia com hAMPE e a terapia combinada. Por outro lado, as diferenças significativas assinaladas por # são relativas à comparação entre a monoterapia com os fármacos e a terapia combinada. As diferenças significativas estão assinaladas por \* ou #, onde \* e # representam  $p < 0,05$  e \*\*\* ou ### representam  $p < 0,001$  (ANOVA com teste post-hoc Tukey).

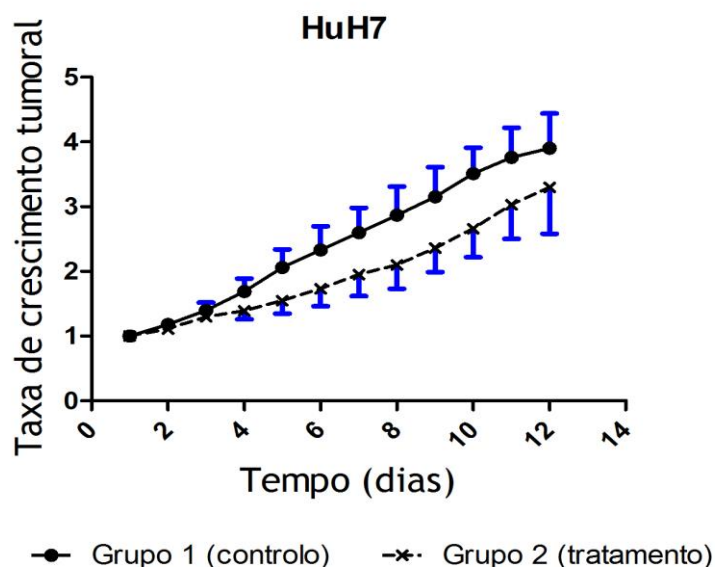
A comparação das terapias combinadas, evidenciadas nas últimas quatro colunas do gráfico 4.32, com o IC50 de cada um dos fármacos obtido em monoterapia, representado pela linha a tracejado no referido gráfico (50%), verifica-se uma diminuição de 34% com significância estatística ( $p < 0,001$ ) da atividade metabólica celular após a combinação dos

hAMPE com o sorafenib, tal como se pode observar na figura 4.32, em relação à monoterapia com o respetivo fármaco. Registou-se um aumento de 53% ( $p < 0,001$ ) da atividade metabólica celular na terapia combinada dos hAMPE com a cisplatina, relativamente à monoterapia com o IC50 do fármaco em questão. Não se verificaram alterações estatisticamente significativas relativamente aos restantes fármacos considerados neste estudo.

### 4.3.9 Estudos *in vivo*

#### Modelo animal e terapêutica

Para determinar o efeito *in vivo* dos hAMPE na terapia do carcinoma hepatocelular, foram desenvolvidos com sucesso modelos heterotópicos em ratinhos da estirpe *BALB/c-nude*, utilizando para tal células das linhas celulares HuH7 e HepG2. Os resultados obtidos, representados nas figuras 4.33 e 4.34, revelam a média e o erro padrão da taxa de crescimento tumoral após administração de células das linhas celulares HuH7 (figura 4.33) e HepG2 (figura 4.34) para o grupo 1 (HuH7) e o grupo 3 (HepG2), cujos animais não foram sujeitos a qualquer tratamento (controlo); e para o grupo 2 (HuH7) e o grupo 4 (HepG2), cujos animais foram sujeitos a terapia com hAMPE. Os resultados encontram-se normalizados em relação ao volume tumoral calculado no primeiro dia de terapia.

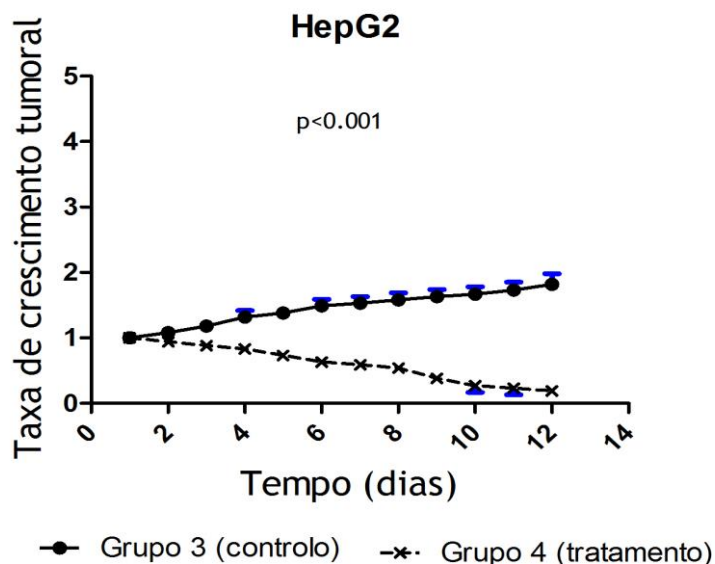


**Figura 4.33** - Taxa de crescimento tumoral dos xenotransplantes obtidos através da inoculação de células da linha celular HuH7 em ratinhos que não foram sujeitos a qualquer tratamento (grupo 1 - controlo) e em ratinhos sujeitos a terapia com os hAMPE (grupo 2 - tratamento). Os resultados estão normalizados em relação ao volume tumoral obtido no primeiro dia de terapia, ao qual foi atribuído o valor de 1. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. Publicado em (Mamede et al. 2015).

Tal como podemos verificar na figura 4.33, os ratinhos inoculados com as células da linha celular HuH7 não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo 1 (controlo) e o grupo 2 (tratamento com hAMPE).

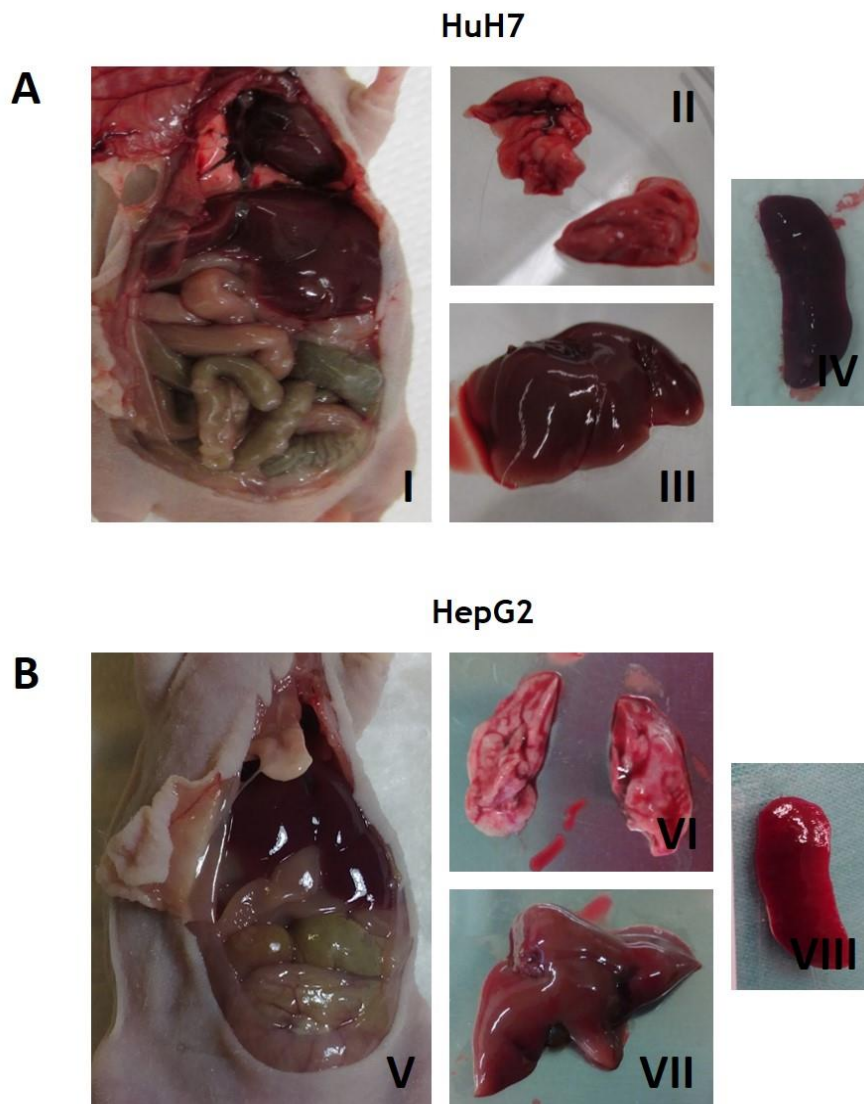
Contrariamente, foram registadas alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre o crescimento tumoral nos animais do grupo 3 (controlo) e do grupo 4 (tratamento) quando os xenotransplantes foram obtidos com recurso a células da linha celular HepG2, tal como se pode verificar na figura 4.34. De facto, o hAMPE induziu uma regressão tumoral nos ratinhos com xenotransplante de células da linha celular HepG2 e sujeitos a terapia com os hAMPE.

Não foram registadas variações na massa corporal ou alterações comportamentais durante o período experimental de 12 dias, bem como quaisquer outras reações adversas, em todos os grupos experimentais considerados nesta experiência.



**Figura 4.34** - Taxa de crescimento tumoral dos xenotransplantes obtidos através da inoculação de células da linha celular HepG2 em ratinhos que não foram sujeitos a qualquer tratamento (grupo 3 - controlo) e em ratinhos sujeitos a terapia com os hAMPE (grupo 4 - tratamento). Os resultados estão normalizados em relação ao volume tumoral obtido no primeiro dia de terapia, ao qual foi atribuído o valor de 1. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão. As diferenças significativas encontram-se assinaladas no gráfico,  $p < 0.001$  (teste paramétrico t de Student). Publicado em (Mamede et al. 2015).

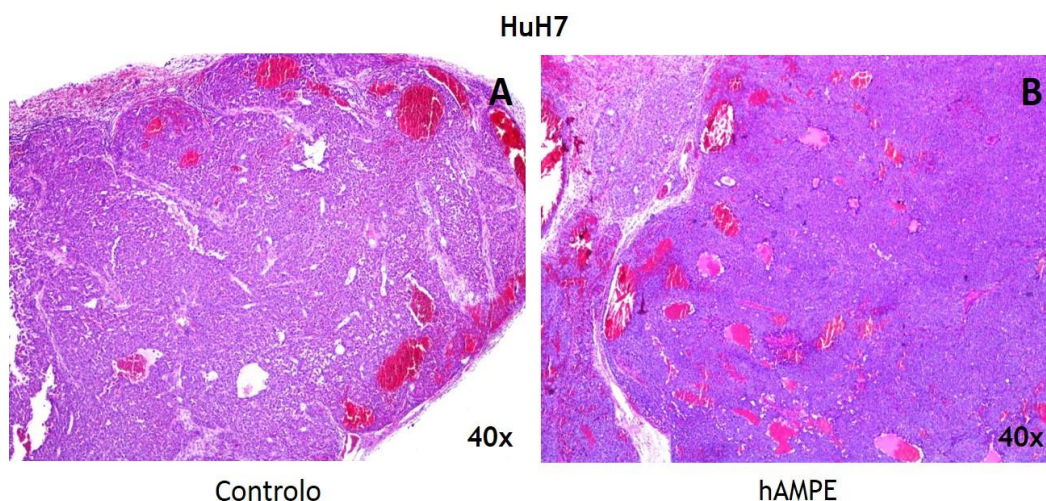
Após ocisão dos animais, o hábito externo e interno dos ratinhos foi analisado e não se registaram alterações macroscópicas após a terapia com os hAMPE nos animais inoculados com as células das linhas celulares HuH7 e HepG2, tal como revelado na figura 4.35 (A) e 4.35 (B), respetivamente.



**Figura 4.35** - Hábito interno após a terapia com o hAMPE em animais com xenotransplantes após inoculação com células das linhas celulares HuH7 (A) e HepG2 (B), com particular ênfase nos pulmões (II e VI), fígado (III e VII) e baço (IV e VIII).

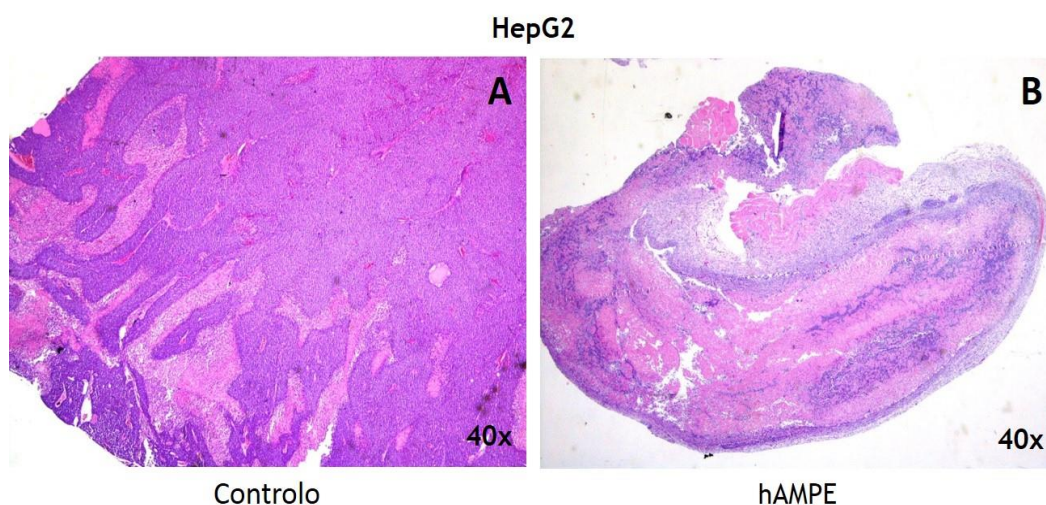
### Análise histopatológica dos tumores

As imagens representativas da análise histopatológica dos xenotransplantes excisados após a oclisão dos ratinhos inoculados com células da linha celular HuH7 estão representadas na 4.36. Na figura 4.36 (A), relativa à condição controlo, pode observar-se um tumor sólido e denso, bem vascularizado, composto por pequenos ninhos e, ocasionalmente, por um padrão trabecular ou pseudoglandular. Relativamente à imagem obtida a partir de um xenotransplante sujeito a terapia com os hAMPE, podemos observar na figura 4.36 (B) um tumor bem vascularizado composto por ninhos sólidos. De facto, a análise histopatológica parece provar que a terapia com os hAMPE não induziu alterações *in vivo* nas células da linha celular HuH7.



**Figura 4.36** - Análise histopatológica dos xenotransplantes obtidos a partir de ratinhos inoculados com células da linha celular HuH7. Dois grupos de animais foram considerados: grupo controlo (A) e grupo sujeito a terapia com os hAMPE (B) (40x). Publicado em (Mamede et al. 2015).

Relativamente à linha celular HepG2, as imagens representativas da análise histopatológica dos xenotransplantes excisados após a oclusão dos ratinhos estão representadas na 4.37. Na figura 4.37 (A), relativa à condição controlo, pode observar-se um tumor composto por ninhos sólidos e trabéculas espessas, apresentando este alguma necrose à periferia. Relativamente à imagem obtida a partir de um xenotransplante sujeito a terapia com os hAMPE, pode observar-se na figura 4.37 (B) um tumor com reação fibroinflamatória na periferia, maioritariamente composto por necrose, apresentando em algumas áreas uma população inflamatória intra-tumoral. Desta forma, a análise histopatológica parece corroborar o facto de os hAMPE serem capazes de induzir regressão tumoral nos ratinhos inoculados com as células HepG2 e posteriormente tratados com os hAMPE.



**Figura 4.37** - Análise histopatológica de xenotransplantes obtidos a partir de ratinhos inoculados com células da linha celular HepG2. Dois grupos de animais foram considerados: grupo controlo (A) e grupo sujeito a terapia com os hAMPE (B) (40x). Publicado em (Mamede et al. 2015).

## **Capítulo 5**

### **Discussão e perspectivas futuras**



Nos últimos anos, as propriedades terapêuticas da membrana amniótica humana têm sido amplamente investigadas. Muitos estudos foram já publicados sobre as peculiares características deste tecido, sendo atualmente reconhecido pela comunidade médica e científica que a membrana amniótica pode ser bastante útil na terapia de diversas patologias humanas (Caruso et al. 2013; Niknejad et al. 2008; Chopra & Thomas 2013; Mamede et al. 2012).

A aplicação da membrana amniótica humana no tratamento da doença oncológica é uma ideia que emergiu em 2008. Tal ideia baseia-se nas propriedades anti-angiogénicas, anti-inflamatórias e pro-apoptóticas deste biomaterial (Seo et al. 2008). Uma vez que a membrana amniótica humana expressa diversos fatores anti-angiogénicos e anti-inflamatórios, pensa-se que este tecido possa atuar como uma barreira física, impedindo a disseminação de diversos mediadores angiogénicos e inflamatórios, característicos do cancro. Por outro lado, devido à secreção de inúmeros fatores anti-angiogénicos, anti-inflamatórios e pro-apoptóticos pela membrana amniótica, pensa-se que estes possam modular as células cancerígenas e o seu microambiente, exercendo assim uma atividade anti-tumoral (Seo et al. 2008; Mamede et al. 2012; Mamede et al. 2015).

Desde 2008, ano em que surgiu a ideia de utilizar a membrana amniótica humana na terapêutica oncológica, têm sido investigados os efeitos das hAECs, das hAMCs e do meio condicionado pela membrana amniótica em linhas celulares cancerígenas de origem humana. Apesar de diversos autores terem já revelado que este biomaterial possui efetivamente efeito anti-cancerígeno, os mecanismos de ação através dos quais a membrana amniótica atua na doença oncológica são ainda pouco conhecidos (Niknejad et al. 2013; Kang, Hwang, et al. 2012; Magatti et al. 2012; Jiao et al. 2012; Rolfo et al. 2014; Mamede et al. 2015). Para além deste facto, o efeito da membrana amniótica enquanto tecido, considerando simultaneamente as suas populações celulares e os seus restantes componentes, não foi investigado até agora na doença oncológica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos hAMPE na doença oncológica, particularmente em células de linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano recorrendo, para tal, a diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como a inúmeras técnicas de biologia celular e molecular. Para tal, foi primeiramente necessário otimizar um protocolo para a obtenção dos hAMPE.

Com o objetivo de obter os hAMPE, recorreu-se a um protocolo, que modificámos, baseado no trabalho de Shao *et al.* (Shao et al. 2004). No protocolo por nós adotado, após a colheita e a receção das membranas amnióticas, estas foram cortadas em pequenos pedaços e desfeitas em PBS estéril com o auxílio de uma pequena picadora. A escolha do PBS como solvente deve-se ao facto desta solução salina isotónica tamponada permitir a estabilização do pH das diversas proteínas constituintes dos hAMPE. Por outro lado, o PBS não possui componentes com absorvância a 280nm, impedindo assim a interferência do solvente com o ensaio de quantificação proteico utilizado posteriormente (Züchner 2015; Layne 1957; Martínez-Maqueda et al. 2013).

Após a adição do PBS aos pequenos pedaços das membranas amnióticas, estes foram homogeneizados num *potter*, devidamente esterilizado, com o objetivo de homogeneizar o tecido e conseqüentemente romper a membrana celular através da pressão e da fricção gerada (Martínez-Maqueda et al. 2013; Goldberg 2008; Grabski 2009; Burden 2008; Züchner 2015).

Posteriormente, a sonicação em banho de ultrassons permitiu também a lise das membranas celulares e a indução da libertação das proteínas. Para tal, foi utilizado o método de eleição para amostras estéreis, a sonicação indireta, para evitar o contacto da sonda com a amostra e a possibilidade de contaminação dos hAMPE. Por outro lado, o método de sonicação indireto é mais efetivo para amostras pequenas pois evita a formação de espuma e a conseqüente perda de amostra (Martínez-Maqueda et al. 2013; Goldberg 2008; Grabski 2009; Burden 2008; Züchner 2015).

Após homogeneização e sonicação, recorreu-se à centrifugação diferencial. Para tal, foi utilizado um programa de centrifugação (14000xG durante 15 min a 4°C) que nos permitiu isolar as proteínas na fração superior solúvel. Os restantes componentes e detritos celulares concentraram-se no *pellet*, tendo sido descartados (Martínez-Maqueda et al. 2013; Goldberg 2008; Grabski 2009; Burden 2008; Züchner 2015).

Na preparação do hAMPE não foram considerados outros meios de extração para além dos mecânicos (homogeneização, sonicação e centrifugação) para impedir a introdução de elementos de origem química ou enzimática no extrato, os quais poderiam condicionar os resultados obtidos nos testes efetuados nos diversos modelos experimentais. Uma vez que a homogeneização, a sonicação e a centrifugação poderiam induzir o aquecimento da amostra, todo o processo foi realizado em gelo ou a 4°C para prevenir a desnaturação e a desestabilização proteica, bem como para diminuir a atividade das proteases (Martínez-Maqueda et al. 2013; Goldberg 2008; Grabski 2009; Burden 2008; Züchner 2015).

Após a extração mecânica, as proteínas isoladas foram filtradas para garantir a sua esterilidade, condição necessária para a realização dos estudos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, as proteínas foram quantificadas recorrendo ao NanoDrop®, o qual tem por base o princípio da absorvância no comprimento de onda de 280nm. De referir ainda que os hAMPE foram divididos em alíquotas para evitar sucessivos ciclos de congelamento e de descongelamento, uma vez que tais ciclos poderiam induzir a degradação proteica (Layne 1957; Züchner 2015).

Para determinar o potencial da terapia com os hAMPE no cancro, foram utilizadas células de 21 linhas celulares cancerígenas de origem humana. Através do ensaio do MTT, foram registados três tipos de resposta celular após o tratamento: estimulação, inibição e ausência de efeito na atividade metabólica, tal como pode ser observado na figura 4.1.

Relativamente às células das linhas celulares de cancro da próstata, os hAMPE foram capazes de inibir a atividade metabólica das células da linha PC3, mas não surtiram efeito na atividade metabólica das células da linha LNCaP.

Efeito similar ocorreu nas linhas celulares do cancro da mama, onde o efeito dos hAMPE foi diferente mediante as células das linhas celulares avaliadas. Assim, a atividade metabólica foi inibida das células da linha HCC1806, mas os extratos foram incapazes de inibir a atividade metabólica das células das linhas MCF7 e HCC1954.

No caso do cancro do cólon, os hAMPE inibiram a atividade metabólica nas células da linha celular WiDr, estimularam a atividade metabólica das células da linha celular C2BBE1 (único caso observado) e não surtiram efeito na atividade metabólica das células da linha celular LS1034.

A atividade metabólica das células de todas as linhas celulares de cancro do pâncreas, de carcinoma hepatocelular, de melanoma, de cancro da bexiga e de cancro do esófago foram inibidas pelos hAMPE. Tal não aconteceu com as células das linhas celulares de cancro do pulmão, de colangiocarcinoma, de osteossarcoma e de cancro do endométrio, cuja atividade metabólica não foi afetada após terem sido submetidas às mesmas condições experimentais, tal como pode ser observado na figura 4.1.

De acordo com os resultados, podemos verificar que o tipo de resposta obtida após o tratamento com os hAMPE difere entre diferentes linhas celulares do mesmo tipo de cancro, o que mostra que esta terapia é altamente dependente das características particulares de cada linha celular.

Vale a pena referir o resultado promissor obtido em células de linhas celulares com perfil tipicamente agressivo, como a linha celular HCC1806. Esta linha celular tem origem num cancro da mama humano triplo negativo, um tipo de cancro extremamente agressivo e para o qual não existem ainda terapias dirigidas eficazes. Este tumor tende a disseminar-se rapidamente e possui, por norma, uma elevada taxa de reincidência (Santos et al. 2014; Dent et al. 2007; Rakha et al. 2007).

O cancro do pâncreas apresenta apenas como única opção curativa a cirurgia radical. Porém, esta opção não pode ser utilizada na maior parte das vezes devido à progressão silenciosa da doença, responsável pela sua deteção tardia. Complementarmente, quando o cancro do pâncreas é acompanhado de sintomas, estes são por norma pouco específicos, dificultando o seu diagnóstico (Oberge 2001). A atividade metabólica das células das duas linhas celulares de cancro do pâncreas humano estudadas, a linha PANC-1 e a linha MIA PaCa-2, foi inibida após a incubação com os hAMPE durante 72 horas. Germanio et al. verificou recentemente que o meio condicionado das hAECs é capaz de inibir a proliferação das células da linha celular PANC-1, comprovando desta forma a elevada sensibilidade destas células aos produtos derivados da membrana amniótica humana, tal como sugerido pelos dados por nós obtidos (Di Germanio et al. 2016).

Na impossibilidade de realizar um estudo mais aprofundado sobre os efeitos anti-cancerígenos dos hAMPE nas 21 linhas celulares inicialmente consideradas neste estudo, foram selecionadas para tal as três linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano. As três linhas celulares selecionadas, a HuH7, a HepG2 e a Hep3B2.1-7, revelaram ser sensíveis aos hAMPE, sendo a sua atividade metabólica inibida pelo tratamento proposto. Por outro

lado, a utilização de três linhas celulares do mesmo tipo de cancro, possuidoras de diferentes perfis genéticos e biológicos, oferece resultados de extrema importância a este estudo (Brito et al. 2014; Gomes et al. 2015). No entanto, é importante no futuro aprofundar o estudo sobre os efeitos dos hAMPE nas células das outras linhas celulares por nós inicialmente avaliadas, tentando averiguar os motivos responsáveis pelas respostas heterogêneas obtidas.

Os tumores primitivos do fígado, entre os quais se enquadra o carcinoma hepatocelular, representam um importante problema de saúde pública devido às suas elevadas taxas de incidência e de mortalidade. Associado ao diagnóstico tardio, também os perfis de quimioresistência e de radioresistência do carcinoma hepatocelular determinam o elevado número de mortes associadas a esta neoplasia (Chuang et al. 2009; Goodman 2007; Brito et al. 2014; Brito et al. 2016).

As opções terapêuticas disponíveis para o carcinoma hepatocelular são reduzidas, sendo o transplante hepático e a ressecção cirúrgica por hepatectomia parcial as únicas opções curativas disponíveis. Uma vez que a maioria dos casos de carcinoma hepatocelular são diagnosticados em estádios avançados da doença, quando as opções curativas não podem ser utilizadas, são normalmente prescritas terapias paliativas com o objetivo de aliviar os sintomas associados à normal progressão da doença, e assim melhorar a qualidade de vida do doente. Desta forma, torna-se urgente encontrar terapias eficientes, capazes de contrariar as estatísticas devastadoras associadas ao carcinoma hepatocelular (Chen & Wang 2015; El-Serag 2012; Mazzanti et al. 2008).

Estudos realizados pelo nosso grupo de investigação comprovaram que as células das linhas celulares utilizadas neste estudo possuem diferente expressão de P53. A linha celular HepG2 expressa uma forma normal da proteína P53. Por outro lado, a linha celular HuH7 possui uma mutação no gene TP53, códon 220, exão 6 *cys-tyr*, que induz uma sobre-expressão da proteína P53, a qual é mutada. Por sua vez, a linha celular Hep3B2.1-7 possui uma deleção homocigótica no exão 11 do gene TP53, o que conduz a uma ausência de expressão da respetiva proteína (Brito et al. 2014; Gomes et al. 2015). Diversos estudos corroboram os resultados obtidos pela nossa equipa de investigação (Nakabayashi et al. 1982; Bressac et al. 1990; Reiser et al. 2000; Zhu et al. 2004; Costanzo et al. 1989).

Com o objetivo de avaliar o efeito dos hAMPE na atividade metabólica, no conteúdo proteico e no conteúdo de ADN nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano, recorreu-se respetivamente aos ensaios do MTT, do SRB e do violeta de cristal. Através destes ensaios de citotoxicidade, pretendeu-se também averiguar se o efeito dos hAMPE era dependente da dose e/ou do tempo.

Os referidos ensaios permitiram verificar que a atividade metabólica, o conteúdo proteico e o conteúdo de ADN foram inibidos após incubação das células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano com os hAMPE de forma dependente da dose e do tempo de exposição, na maioria dos casos considerados, tal como pode ser evidenciado nas figuras 4.2, 4.3 e 4.4.

Para a maior concentração (1µg/µL) e o maior período de tempo (72 horas) utilizados neste estudo, podemos verificar pela atividade metabólica e pelo conteúdo de ADN que as células da linha celular HuH7 são as menos sensíveis aos hAMPE. A sobre-expressão da P53 nas células HuH7 pode ser responsável por um efeito dual, podendo aumentar ou reduzir a sua sensibilidade aos hAMPE (Cadwell & Zambetti 2001; Brito et al. 2012). Algumas formas mutadas da P53 induzem um “ganho de função”, que se manifesta pelo aumento do crescimento celular e pelo potencial tumorigénico (Cadwell & Zambetti 2001). Tendo em conta os resultados por nós obtidos, podemos especular se a sobre-expressão da P53 verificada nestas células da linha HuH7 não poderá condicionar a sua maior resistência aos hAMPE em comparação com as restantes linhas celulares.

Podemos também verificar que, considerando a mesma concentração de hAMPE e o mesmo tempo de incubação, a atividade metabólica, o conteúdo proteico e o conteúdo de ADN nas células da linha celular Hep3B2.1-7 são inibidos. Uma vez que as células da linha celular Hep3B2.1-7 não expressam a P53, espera-se que estas apresentem resistência ao tratamento (Cadwell & Zambetti 2001; Brito et al. 2012). Tal resultado confere um carácter altamente promissor ao tratamento com os hAMPE neste tipo de tumor.

De notar que, após incubação com 1µg/µL de hAMPE durante 72 horas, o conteúdo proteico das células de todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano avaliado neste estudo foi grandemente inibido, tal como demonstrado na figura 4.3. Tendo em conta estes resultados e o princípio de cada um dos ensaios de citotoxicidade utilizados, é de esperar que os hAMPE consigam atuar sobre diversas vias de sinalização e diversos alvos moleculares, bem como modular o microambiente oxidativo tumoral.

Em termos gerais, não é desejável que os tratamentos anticâncer atinjam as células saudáveis. Por este motivo, avaliou-se o efeito dos hAMPE em células de uma linha celular não tumorigénica de origem fibroblástica, a linha celular HFF1. A atividade metabólica, o conteúdo proteico e o conteúdo de ADN não foram inibidos pela incubação com os hAMPE nestas células, tal como evidenciado nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3. Verificou-se até que os hAMPE foram capazes de estimular o conteúdo proteico e o conteúdo de ADN nos fibroblastos.

Estes resultados indicam que esta terapia poderá apresentar citotoxicidade seletiva. De acordo com esta premissa, as células tumorais serão seletivamente sensíveis à exposição aos hAMPE, não sendo esta terapia capaz de modular o comportamento de células não tumorigénicas.

Yoneda et al. verificaram que o ácido hialurónico é capaz de modular a proliferação de fibroblastos. Por esta razão, o ácido hialurónico, presente em elevada concentração na membrana basal da membrana amniótica, poderá potenciar o conteúdo proteico e o conteúdo de ADN nos fibroblastos (Yoneda et al. 1988). Resultados obtidos por Kang et al. revelaram que as hAECS não são capazes de alterar a proliferação de fibroblastos bovinos. Contrariamente, são capazes de exercer um efeito anti-proliferativo nas células da linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 (Kang et al. 2012). Recentemente, Germanio et al. revelou que o meio condicionado derivado da membrana amniótica é capaz de inibir a

proliferação de células de diversas linhas celulares tumorais, incluindo a linha celular HepG2, mas incapaz de alterar a proliferação de fibroblastos humanos (Di Germanio et al. 2016).

No futuro, o efeito dos hAMPE na atividade metabólica, no conteúdo proteico e no conteúdo de ADN deverá ser avaliado numa linha celular de hepatócitos normais, células que representariam o controlo adequado para este trabalho experimental.

Para determinar quais as vias de atuação dos hAMPE e para perceber se este tratamento é capaz de induzir a morte nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano utilizadas, recorreu-se à análise morfológica por microscopia ótica após coloração celular com o corante de May-Grünwald-Giemsa. Para tal, selecionou-se a maior concentração de hAMPE (1µg/µL) e o maior período de tempo (72 horas) considerados neste estudo. A mesma concentração e período de tempo foram considerados em todos os restantes ensaios realizados.

Após a incubação com os hAMPE, como pudemos ver nas figuras 4.5 II, 4.5 IV e 4.5 VI, as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular apresentaram um elevado número de projeções citoplasmáticas (*blebs*), uma alteração morfológica tipicamente induzida pela apoptose (Van Cruchten & Van den Broeck 2002; Edinger & Thompson 2004). Para além desta alteração, as células da linha celular HepG2 (figura 4.5 IV) apresentaram também lise citoplasmática, uma alteração morfológica ditada pela necrose (Van Cruchten & Van den Broeck 2002; Edinger & Thompson 2004). Relativamente à elevada vacuolização registada nas células de todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular (figuras 4.5 II, 4.5 IV e 4.5 VI) não existe consenso na literatura sobre a relação entre esta alteração morfológica com a apoptose ou com a necrose, existindo autores que atribuem a vacuolização a diferentes tipos de morte celular (Van Cruchten & Van den Broeck 2002; Edinger & Thompson 2004; González-Polo et al. 2005).

No entanto, os ensaios com a anexina V e o iodeto de propídeo (figura 4.6) permitiram confirmar que os hAMPE foram capazes de induzir apoptose nas células de todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano estudadas. Relativamente à necrose, este tipo de morte foi apenas detetado nas células da linha celular HepG2. Desta forma, os ensaios realizados com recurso à anexina V e ao iodeto de propídeo parecem corroborar as alterações morfológicas observadas recorrendo à coloração de May-Grünwald-Giemsa.

O motivo pelo qual uma célula morre por necrose ou por apoptose depende da natureza do sinal de morte e de diversas características celulares fisiológicas (Elmore 2007). Sabe-se atualmente que a necrose ocorre em células sujeitas a um elevado stresse bioenergético, certamente presente na linha celular HepG2 (Edinger & Thompson 2004).

A compreensão dos mecanismos de morte celular permite o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e dirigidas. Desta forma, sabendo que a ativação da apoptose pode ser iniciada a partir de duas vias, a via extrínseca ou a via intrínseca, avaliou-se a expressão de várias proteínas envolvidas nas duas vias do processo apoptótico.

A regulação da função mitocondrial é essencial para o metabolismo energético e para a homeostasia do cálcio, não sendo por isso surpreendente que a disfunção mitocondrial possa

causar a morte celular. A mitocôndria desempenha um importante papel na regulação da morte celular devido à liberação de proteínas, tal como o citocromo C, num complexo processo que pode ser modulado pelos membros da família BCL-2 (Bernardi et al. 2001).

Para analisar as alterações mitocondriais após o tratamento com os hAMPE, foram analisadas a razão BAX/BCL2, a expressão do citocromo C e o PMM nas células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano. Relativamente à linha celular HuH7, verificou-se um aumento na razão BAX/BCL2 (figura 4.7) e na expressão do citocromo C (figura 4.8), parecendo estes resultados estar de acordo com um perfil de morte celular induzida pela via intrínseca da apoptose. Por outro lado, a incubação com os hAMPE resultou no aumento da razão BAX/BCL2 nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7, tal como evidenciado na figura 4.7. No entanto, não se verificou o aumento da expressão do citocromo C nas células destas linhas celulares nas mesmas condições experimentais. Surpreendentemente, o PMM (figura 4.9) aumentou após o tratamento com os hAMPE em todas as linhas celulares.

Os mecanismos de sinalização responsáveis pela liberação do citocromo C da membrana mitocondrial não são ainda bem conhecidos, tendo surgido ao longo dos anos várias hipóteses sobre este tema. Alguns autores acreditam que a abertura de um poro transitório, composto por proteínas como a hexocinase II e os canais iónicos dependentes de voltagem (VDAC, do inglês *voltage dependent anion channel*), seja um dos eventos que induz a liberação mitocondrial do citocromo C. A abertura deste poro é responsável pelo equilíbrio de solutos através da membrana mitocondrial, resultando na sua despolarização e consequente alteração da matriz mitocondrial (Von Ahn et al. 2000; Martinou et al. 2000; Pinto et al. 2010; Villinger et al. 2010; Shoshan-Barmatz et al. 2015).

Tendo em conta os resultados obtidos, pode especular-se se os hAMPE terão a capacidade de inibir algum fator mediador da liberação do citocromo C, como por exemplo os VDAC, nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7. Na verdade, os hAMPE foram capazes de induzir o aumento da razão BAX/BCL2 nas células destas duas linhas celulares, não sendo no entanto registada a consequente liberação do citocromo C. A literatura refere que a BAX é responsável por induzir a liberação do citocromo C ao interagir diretamente com os VDAC, causando alterações mitocondriais. Estas alterações são dependentes de cálcio e de ATP. Estudos indicam que os fármacos que inibem a atividade dos VDAC previnem a liberação do citocromo C mediada pela BAX e a perda do PMM. Inúmeros autores defendem que a perda do PMM não é a causa da liberação do citocromo C, mas sim a sua consequência (Martinou et al. 2000; Perry et al. 2011; Cao et al. 2007; Sánchez-Alcázar et al. 2000; Ganguly et al. 2010; Gogvadze et al. 2006; Choi et al. 2009). Desta forma, os hAMPE poderão inibir a liberação do citocromo C através da inibição direta dos VDAC. Este fator, associado ao aumento de ROS ou a alterações no fluxo de cálcio e de potássio, poderão induzir o aumento do PMM nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 (Martinou et al. 2000; Von Ahn et al. 2000; Shoshan-Barmatz et al. 2015; Villinger et al. 2010).

Nas células da linha celular HuH7, a liberação do citocromo C parece ser um evento independente da perda do PMM. A independência destes dois eventos tem sido sugerida por vários autores (Martinou et al. 2000; Von Ahnen et al. 2000; Pinto et al. 2010).

Vale a pena clarificar no futuro o motivo pelo qual ocorre o aumento do PMM em todas as linhas celulares e qual a relação entre este fator e a liberação do citocromo C nas células de carcinoma hepatocelular humano após incubação com os hAMPE.

As caspases são proteases que têm a capacidade de reconhecer e de clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Estas proteases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos, induzindo a condensação e a fragmentação nuclear, bem como a externalização de fosfolípidos membranares, responsáveis pela sinalização celular para a fagocitose por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, das quais seis (caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10) participam no processo apoptótico. As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogénios as quais, após um sinal de morte celular, são ativadas por clivagem proteolítica (Grivicich et al. 2007). Uma vez que as caspases são ativadas após a dimerização e a clivagem das pro-caspases (McIlwain et al. 2013), no nosso trabalho foi possível determinar a forma não ativada das caspases 3, 8 e 9, comumente denominadas por pro-caspases 3, 8 e 9, metodologia já utilizada por outros autores (Mukhopadhyay et al. 2001; Yao et al. 2012).

As duas vias apoptóticas convergem num mesmo terminal, iniciado pela clivagem da pro-caspase 3 (Elmore 2007). Os resultados obtidos provam que os hAMPE são capazes de diminuir a expressão da pro-caspase 3 em todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano (figura 4.10), um precursor inativo a partir do qual duas subunidades da caspase 3 são produzidas durante a apoptose (McIlwain et al. 2013). Desta forma, a diminuição da pro-caspase 3 induz, consequentemente, um aumento na caspase 3, confirmando assim a iniciação da apoptose em todas as células das linhas celulares de carcinoma hepatocelular humano após o tratamento com os hAMPE. Para estudar o mecanismo ascendente da ativação da caspase 3, a expressão da caspase 8 e da caspase 9 também foi estudada. A caspase 8 participa na apoptose induzida pela via extrínseca, enquanto a caspase 9 é ativada como resultado da liberação do citocromo C através da via intrínseca ou mitocondrial (Kruidering & Evan 2000; Johnson & Jarvis 2004; McIlwain et al. 2013).

Os resultados provam que os hAMPE são capazes de reduzir a expressão da pro-caspase 8 e, consequentemente, aumentar a expressão da caspase 8 ativada nas células HepG2 e Hep3B2.1-7 (figura 4.11). Por outro lado, a expressão da pro-caspase 8 não foi alterada pelos hAMPE na linha celular HuH7. De forma contrária, verificou-se uma diminuição da pro-caspase 9 e um aumento da expressão da caspase 9 na linha celular HuH7. Tal não foi observado nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7. (figura 4.12).

Tendo em conta estes resultados, a apoptose parece ocorrer nas células HepG2 e Hep3B2.1-7 através de um mecanismo mediado pela via extrínseca, enquanto a apoptose nas células da linha celular HuH7 parece ocorrer através da via intrínseca (McIlwain et al. 2013).

Desta forma, a morte das células na linha celular HuH7 parece ser mediada pelo stresse celular induzido pelos hAMPE. Por outro lado, a morte na linha celular HepG2 e Hep3B2.1-7 parece ser mediada por ligandos que se ligam aos recetores de morte. Tais ligandos podem ser proteínas expressas na membrana amniótica e nas suas células, como o ligando Fas, confirmando assim as propriedades pro-apoptóticas deste tecido (Van Cruchten & Van den Broeck 2002; Caruso et al. 2013).

De notar que Jiao *et al.* (Jiao et al. 2012) e Niknejad *et al.* (Niknejad et al. 2014) verificaram que as células derivadas da membrana amniótica e os seus sobrenadantes são capazes de aumentar a expressão da caspase 3 e da caspase 8 em células de linhas celulares de glioma, de cancro do colo do útero e de cancro da mama, corroborando assim o potencial pro-apoptótico dos derivados da membrana amniótica.

AS ROS são uma enorme classe de espécies radicalares que são produzidas em todas as células como um produto normal dos processos metabólicos. Dependendo da sua concentração, as ROS possuem diferentes efeitos. Em baixas concentrações, as ROS aumentam a proliferação e a sobrevivência celular. Em altas concentrações, as ROS podem provocar danos às macromoléculas, incluindo o ADN, podendo causar a permeabilização da mitocôndria, o que se traduz na libertação do citocromo C e na apoptose (Cairns et al. 2011).

O tratamento com os hAMPE pareceu ser capaz de modificar o stresse oxidativo nas células de carcinoma hepatocelular, tal como evidenciado nas figuras 4.13 e 4.14. O aumento do radical superóxido nas linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 foi provavelmente o resultado do aumento do PMM induzido pelo tratamento com os hAMPE (Choi et al. 2009). Por outro lado, a diminuição do radical superóxido observada nas células da linha celular HuH7, pode ser provavelmente explicada por uma rápida dismutação desta ROS pela superóxido dismutase (SOD), com formação de peróxido de hidrogénio, cujos níveis nesta linha celular aumentaram após o tratamento com os hAMPE (Valko et al. 2007). A diminuição do peróxido de hidrogénio nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7 pode ser devida à rápida conversão desta ROS em outras espécies radicalares mais prejudiciais para a célula, tais como o radical hidroxilo, através da reação de Fenton/Haber-Weiss (Valko et al. 2007; Li & Schellhorn 2007).

O peróxido de hidrogénio é eficientemente eliminado pela enzima glutathione peroxidase (GPx), que requer a GSH como doadora de eletrões (Valko et al. 2007). Na verdade, as células contrabalançam os efeitos deletérios das ROS através da produção de moléculas antioxidantes. Estas moléculas reduzem os níveis excessivos das ROS para prevenir danos celulares irreversíveis. Muitos destes sistemas antioxidantes baseiam-se no poder redutor de fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*) para manter as suas atividades (Cairns et al. 2011).

Uma vez que os níveis de peróxido de hidrogénio diminuíram após o tratamento com os hAMPE nas células das linhas celulares HepG2 e Hep3B2.1-7, a produção celular de GSH também diminuiu pois esta não é necessária para a destoxificação celular. Os nossos

resultados sugerem que o NADPH intracelular fica comprometido após o tratamento com os hAMPE, uma vez que a atividade metabólica (avaliada através da reação do MTT com o NADPH) foi inibida. Tendo em conta que a glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida novamente a GSH pela enzima glutathiona redutase, que utiliza o NADPH como doador de eletrões, a diminuição da GSH em todas as linhas celulares em estudo pode ser uma consequência do comprometimento do NADPH celular (Valko et al. 2007). De facto, o NADPH funciona como cofator e providencia o poder redutor em muitas reações enzimáticas que são cruciais para a biossíntese de macromoléculas. Por outro lado, o NADPH é um antioxidante que neutraliza as ROS. Em particular, o NADPH fornece o poder redutor para os sistemas GSH e tioredoxina (TRX), que neutralizam as ROS e reparam os danos induzidos por estas (Cairns et al. 2011).

O ensaio PEG/Hoechst permite-nos quantificar pequenos fragmentos de ADN (0-1kb) (Georgiou et al. 2009). Estes fragmentos são indicadores de danos no ADN mediados pela necrose e pela apoptose (Georgiou et al. 2009). Desta forma, e de acordo com os resultados obtidos e representados na figura 4.17, os hAMPE induziram um aumento da fragmentação no ADN nas células da linha HepG2, resultado que corrobora o perfil de morte celular por apoptose e por necrose induzido pelos hAMPE nesta linha celular. Para confirmar estes resultados foi utilizado o ensaio cometa, uma técnica que permite detetar quebras no ADN, tanto quebras simples como quebras nas duas cadeias (Santos et al. 2014; A. Collins et al. 1997; Tice et al. 2000).

Os resultados obtidos através do ensaio cometa corroboraram os resultados obtidos através do ensaio PEG/Hoechst. De facto, o ensaio cometa comprovou o elevado dano no ADN das células HepG2, tal como pode ser observado nas figura 4.15 e 4.16. Os elevados níveis de radical superóxido nas células da linha celular HepG2, induzidos após o tratamento com os hAMPE, podem provavelmente induzir danos no ADN e, conseqüentemente, a apoptose e a necrose (Reuter et al. 2010). A suportar este efeito está o facto de não terem sido encontrados danos no ADN das células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 que, por sua vez, apresentaram baixos níveis de radical superóxido quando comparadas com as células da linha celular HepG2. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de formação de ligações cruzadas intracadeia ou intercadeia de ADN nas células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.1-7 (Santos et al. 2014).

Devido aos elevados danos no ADN das células HepG2, é possível que a necrose tenha sido induzida pela proteína de reparação do ADN poli(ADP-ribose)polimerase [PARP, do inglês *poly(ADP-ribose)polymerase*]. Esta proteína induz a rápida depleção do dinucleótido de nicotinamida e de adenina (NAD, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) nuclear e citoplasmático e, conseqüentemente induz a inibição da glicólise e a morte celular por necrose (Edinger & Thompson 2004; Lin & Yang 2008).

Uma vez que verificámos que os hAMPE induziram apoptose nas células das linhas celulares HuH7 e Hep3B2.17, pode questionar-se se a morte por apoptose poderá ocorrer sem fragmentação no ADN das células. Apesar de este não ser um perfil comum, existem já diversos estudos publicados sobre o evento da apoptose sem a indução detetável da

fragmentação de ADN. Por outro lado, outros autores atribuem à fragmentação do ADN uma ocorrência tardia na sequência de eventos que medeiam a morte celular por apoptose (Oberhammer et al. 1993; Zamai et al. 1996; Schulze-Osthoff et al. 1994; J. Collins et al. 1997; Yuste et al. 2001).

As mutações no gene supressor tumoral *TP53* são alterações genéticas muito comuns nos câncros humanos, podendo esta alteração condicionar a resposta aos tratamentos (Chan & Lung 2004). As mutações no gene *TP53* originam alterações na expressão da proteína correspondente, a P53. Sabe-se que, de forma geral, os tumores com baixa expressão ou com expressão mutada da P53 são geralmente resistentes à terapia (Brito et al. 2012; Brito 2014).

A expressão de P21 é comumente regulada de forma positiva pelo gene supressor tumoral *TP53* (Macleod et al. 1995). No entanto, a expressão da P21 pode também ser regulada independentemente da P53 (Macleod et al. 1995).

Os hAMPE diminuíram a expressão da P53 nas células da linha celular HuH7 (figura 4.19), motivo pelo qual o aumento da P21 nesta linha celular é provavelmente induzido por um mecanismo independente da P53 e pode estar relacionada com a aquisição de resistência aos hAMPE. Diversos estudos demonstraram que a localização citoplasmática induzida da P21 previne a apoptose em diferentes tipos de células tumorais, sendo por isso importante no futuro estudar pormenorizadamente a localização celular desta proteína (Liu et al. 2013). Por outro lado, nas células da linha celular HepG2 a expressão da P21 diminuiu (figura 4.20). A diminuição da P21 pode ser uma consequência direta da inibição da P53 pelo tratamento com os hAMPE. Sabe-se também que a atenuação dos níveis de expressão da P21 aumenta a apoptose celular em resposta a agentes capazes de induzir danos no ADN, tal como foi verificado nas células da linha celular HepG2 através do ensaio PEG/Hoechst e do ensaio cometa (Liu et al. 2013).

A inibição da P53 pode ser uma consequência dos elevados danos no ADN induzidos pelos hAMPE nas células da linha celular HepG2 depois de 72 horas de incubação. Desta forma, no futuro este estudo deve ser repetido tendo em conta um período de incubação inferior, para assim ser confirmada a expressão da P53 após incubação com os hAMPE.

É bem sabido que a P21 pode inibir a progressão do ciclo celular através de dois mecanismos independentes, ou seja, através da inibição dos complexos cinases/CDK e da inibição da função do antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*), que resultam no atraso do ciclo celular nas fases G1 e G2, respetivamente (Cayrol et al. 1998).

Uma vez que os hAMPE induziram um atraso na fase G2/M do ciclo das células da linha celular HuH7, tal como evidenciado na figura 4.18, é provável que o aumento da P21 tenha inibido o PCNA. Sabe-se que o PCNA tem como função organizar numerosos componentes para a replicação do ADN e a consequente progressão do ciclo celular (Punchihewa et al. 2012). Desta forma, a inibição do PCNA poderá ser responsável por diversos resultados experimentais apresentados neste trabalho

Por outro lado, uma vez que os hAMPE induziram um elevado dano no ADN das células da linha celular HepG2, e uma vez que o *checkpoint* G2/M é essencial para a manutenção da estabilidade genómica, o atraso do ciclo celular das HepG2 nesta fase do ciclo pode também ser facilmente explicado (Stark & Taylor 2004).

Relativamente ao atraso na fase S observado nas células da linha celular Hep3B2.1-7, tal pode dever-se à inibição da ciclina A-CDK2, responsável por mediar a fase S do ciclo celular (Shapiro & Harper 1999).

A  $\beta$ -catenina fosforilada possui um papel crucial na invasão e no desenvolvimento de muitos tipos de tumores. Esta proteína foi originalmente identificada como um dos componentes das estruturas de adesão célula-célula, interagindo com o domínio citoplasmático da E-caderina e ligando a E-caderina à  $\alpha$ -catenina. A fosforilação da  $\beta$ -catenina causa a dissociação destes contactos célula-célula. Desta forma, a diminuição da expressão da  $\beta$ -catenina em todas as linhas celulares estudadas, evidenciada na figura 4.21, pode estar correlacionada com a inibição da proliferação celular, bem como com a redução da capacidade invasiva das células das linhas celulares em estudo (Wu et al. 2013; Thakur & Mishra 2013; Dudek et al. 2014; Voronkov & Krauss 2013).

Considerando o metabolismo, sabe-se que as células cancerígenas exibem normalmente uma elevada taxa de glicólise. Esta alteração metabólica tem provado ser bastante útil na deteção e no estadiamento tumoral. Têm sido também considerados vários compostos, como a 2-desoxiglicose ou o 3-bromopiruvato, com o objetivo de tentar bloquear o consumo de glicose pelas células cancerígenas. No entanto, até agora não foram encontradas estratégias terapêuticas eficazes tendo por base este princípio (Cairns et al. 2011; Pelicano et al. 2006; Xu et al. 2005).

Com o objetivo de avaliar se os hAMPE podiam ser utilizados como uma nova estratégia terapêutica tendo como alvo os GLUT, decidimos avaliar a expressão destes transportadores nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular após incubação com os hAMPE. Sabe-se que a maioria dos GLUT se encontram expressos nos hepatócitos, principalmente o GLUT1, o GLUT2, o GLUT5, o GLUT8 e o GLUT10 (Amann & Hellerbrand 2009).

Através dos resultados obtidos, pode concluir-se que o tratamento com os hAMPE inibiu a expressão do GLUT3 nas células da linha celular HuH7 (figura 4.24) e do GLUT5 nas células da linha celular HepG2 (figura 4.25). No entanto, verificou-se que o mesmo tratamento induziu um aumento da expressão do GLUT1 nas células da linha celular Hep3B2.1-7 (figura 4.22).

Tendo em conta a existência de diversas isoformas dos GLUT é importante no futuro estudar a expressão e a função de todas as isoformas de forma a esclarecer o efeito do tratamento com os hAMPE no mecanismo glicolítico do carcinoma hepatocelular. A inibição dos GLUT por parte dos hAMPE pode contribuir para a inibição da glicólise e, consequentemente, da atividade metabólica e da capacidade proliferativa das células cancerígenas (Brito 2014). A associação desta informação com o estudo do perfil glicolítico das células do carcinoma hepatocelular após tratamento com os hAMPE, através da técnica de

espectroscopia por ressonância magnética nuclear, poderá ser essencial para avaliar o efeito dos hAMPE a nível celular.

A reduzida taxa de resposta à quimioterapia por parte do carcinoma hepatocelular pode ser parcialmente atribuída à expressão das proteínas MDR (Brito et al. 2014). De forma a solucionar este problema, a inibição farmacológica dos transportadores MDR tem sido largamente estudada, uma vez que a aplicação de inibidores farmacológicos se baseia na modulação da atividade das proteínas MDR por inibição competitiva ou na indução de alterações conformacionais nas proteínas MDR, prevenindo o reconhecimento de substratos ou a hidrólise do ATP (Casalta-Lopes et al. 2011).

A PGP é um transportador de membrana capaz de atuar sobre um grupo de substratos estruturalmente e funcionalmente não relacionados. Este transportador de extrusão atua nos substratos que entram na célula, os quais são bombeados para o seu exterior usando para tal a hidrólise do ATP como fonte de energia. A PGP pode assim favorecer o efluxo de várias classes de fármacos comumente utilizados no tratamento do cancro, como por exemplo a doxorrubicina. A elevada expressão de PGP, comum em células cancerígenas, pode potenciar a resistência a fármacos através do aumento do efluxo dos fármacos citotóxicos, com consequente redução da sua eficácia clínica. Tal efeito potencia a quimioresistência, à qual se associa a potenciação da malignidade. Também a expressão de MRP1 e de LRP, membros da família das proteínas MDR, está associada a quimioresistência e ao mau prognóstico tumoral (Chan & Lung 2004; Szakács et al. 2006; Bradley & Ling 1994; Shen et al. 1991).

De acordo com os resultados por nós obtidos, podemos concluir que os hAMPE foram capazes de inibir a expressão da PGP nas células Hep3B2.1-7 (figura 4.27) e a expressão de MRP1 nas células HepG2 (figura 4.28). Por outro lado, os hAMPE induziram o aumento da expressão da proteína MRP1 nas células da linha celular HuH7.

Sabe-se atualmente que a expressão de certas mutações na P53 no carcinoma hepatocelular pode aumentar a resistência a fármacos (Chan & Lung 2004; Tsang et al. 2003). Uma vez que as células da linha celular HuH7 expressam uma forma mutada da P53, esta proteína pode ser responsável pela resistência ao tratamento com os hAMPE. Através dos nossos resultados, verificou-se também o aumento da P21 nas células HuH7, podendo este fator estar concomitantemente relacionado com a aquisição de resistência celular (Liu et al. 2013).

Através da análise dos nossos resultados, parece que a LRP não é um alvo dos hAMPE em nenhuma das linhas celulares de carcinoma hepatocelular, uma vez que os hAMPE não alteraram a expressão desta proteína nas linhas celulares, tal como registado na figura 4.29.

Para além das proteínas e dos vários parâmetros celulares avaliados durante a realização deste trabalho, é extremamente relevante continuar a estudar outras proteínas e outras vias de sinalização que poderão ser alvo dos hAMPE no carcinoma hepatocelular, contribuindo assim para o esclarecimento da ação anti-cancerígena da membrana amniótica.

A terapia combinada entre fármacos tem sido largamente aplicada no tratamento de diversas patologias. O objetivo da combinação entre fármacos é potenciar o efeito da

terapêutica, uma vez que são atingidos vários alvos celulares simultaneamente, o que permite diminuir as concentrações utilizadas e, potencialmente, a resistência celular. A terapia combinada resulta ainda na diminuição da toxicidade e dos efeitos adversos induzidos no doente (Brito 2014; Chou 2010).

Neste estudo avaliou-se a terapia combinada entre os hAMPE e quatro fármacos vulgarmente utilizados na terapia do carcinoma hepatocelular, sendo eles o 5-FU, a doxorubicina, a cisplatina e o sorafenib. O 5-FU, a doxorubicina e a cisplatina são fármacos utilizados na quimioterapia sistémica paliativa do carcinoma hepatocelular. Estes fármacos atuam diretamente ou indiretamente na síntese do ADN, induzindo assim um decréscimo da proliferação celular e, conseqüentemente, a morte celular. Por outro lado, o sorafenib é um inibidor multikinase capaz de inibir a atividade de diversas tirosinas-kinases envolvidas na angiogénese e na progressão tumoral. Este fármaco tem revelado possuir efeitos promissores na terapia do carcinoma hepatocelular (Furuse 2008; Brito et al. 2012; Giglia et al. 2010).

Os hAMPE foram capazes de aumentar a eficácia de todos os fármacos, potenciando o seu efeito, nas células das linhas celulares HuH7 (figura 4.30) e HepG2 (figura 4.31). Tal como referido anteriormente, a sobre-expressão da P53 mutada nas células HuH7 pode ter um efeito dual, podendo aumentar ou reduzir a sua sensibilidade aos tratamentos, tal como já foi referido anteriormente. Tumores com este perfil são extremamente difíceis de tratar. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que a associação dos hAMPE com os quatro fármacos pode aumentar a eficácia da quimioterapia e da terapia dirigida nos tumores com sobre-expressão da P53 mutada (Hussain et al. 2007; Chan & Lung 2004; Cadwell & Zambetti 2001; Hsieh et al. 2003).

Com base nos resultados por nós obtidos, é de esperar que a terapia combinada entre os hAMPE e o 5-FU, a doxorubicina e a cisplatina nas células da linha celular HepG2 amplifique os danos no ADN devido à atuação em simultâneo no ADN. De facto, os efeitos lesivos do 5-FU, da doxorubicina e da cisplatina a nível do ADN nas células da linha celular HepG2 foram já demonstrados por outros autores (Brito et al. 2012; Cervello et al. 2012). Neste trabalho, ficou também provado que os hAMPE induzem danos no ADN nas células da linha celular HepG2, tal como evidenciado nas figuras 4.15, 4.16 e 4.17. Por este motivo, a ação conjunta, mediada por cada um dos fármacos e pelos hAMPE, poderá ser responsável pelos promissores resultados obtidos na terapia combinada nas células da linha celular HepG2.

Nas células da linha celular Hep3B2.1-7, os hAMPE apenas aumentaram a eficácia do sorafenib e antagonizaram o efeito da cisplatina (figura 4.32). O sorafenib é um fármaco que devido ao seu mecanismo de ação é capaz de reduzir a angiogénese tumoral (Liu et al. 2006). Por isso, a associação da atividade anti-angiogénica do sorafenib com a da membrana amniótica pode explicar os resultados obtidos relativamente a esta associação, não só nas células da linha celular Hep3B2.1-7, como nas outras duas linhas celulares estudadas. Neste contexto, devemos referir que já foi documentado o antagonismo entre os inibidores do EGFR e a cisplatina (Ahsan et al. 2010). Sabendo que as células da linha celular Hep3B2.1-7 sobre-

expressam EGFR e que as células das linhas celulares HepG2 e HuH7 não expressam ou expressam residualmente o EGFR (Jiang et al. 2011; Zhao et al. 2013) pode especular-se se os hAMPE se podem ligar ao EGFR, competindo assim com a cisplatina.

No futuro, deve ser realizado um estudo pormenorizado sobre as vias de sinalização que medeiam a terapia combinada entre os hAMPE e o 5-FU, a doxorubicina, a cisplatina e o sorafenib, bem como sobre os alvos celulares desta terapia. Tal estudo pode contribuir, não só para esclarecer o potencial anti-cancerígeno da membrana amniótica por si só, como também para fomentar novas formas de terapia no carcinoma hepatocelular. O recurso a técnicas de metabolómica, proteómica e lipidómica pode ser de inegável interesse no contexto destes esclarecimentos.

Os modelos animais de cancro humano são indispensáveis para o desenvolvimento de novos agentes anti-cancerígenos. Estes modelos oferecem a possibilidade de determinar as causas e os tratamentos de uma neoplasia, pelo que representam um potencial enorme na área da oncologia (Ruggeri et al. 2014; Steele et al. 2005).

Considerando a política dos 3R's, escolheram-se duas linhas celulares para realizar os estudos *in vivo* tendo em conta as diferentes vias de morte observadas *in vitro*, as células das linhas HuH7 e HepG2. Para tal, foi desenvolvido um modelo animal heterotópico de carcinoma hepatocelular no dorso dos ratinhos. Após o desenvolvimento do modelo animal, foi escolhida como via de administração dos hAMPE a via intraperitoneal devido à facilidade com que os hAMPE podem ser administrados. Outras vias de administração seriam de difícil execução, tendo em conta o reduzido tamanho da estirpe animal utilizada (murganhos *Balb/c-nude*).

Os hAMPE foram incapazes de inibir a taxa de crescimento tumoral nos ratinhos inoculados com as células da linha celular HuH7, tal como registado na figura 4.33. Tal pode dever-se, pelo menos em parte, à aquisição de um fenótipo resistente devido ao aumento da expressão da proteína MRP1 e da P21 após o tratamento com os hAMPE, o que está de acordo com dados já publicados por outros autores (Liu et al. 2013; Tsang et al. 2003).

Por outro lado, os hAMPE induziram uma regressão tumoral praticamente completa nos ratinhos inoculados com células da linha celular HepG2 (figura 4.34). Esta regressão tumoral foi acompanhada por uma reação inflamatória e um padrão necrótico, tal como observado na figura 4.37. A terapia revelou ser um sucesso nos xenotransplantes obtidos com as células da linha celular HepG2, tendo sido alcançados resultados que revelam que os hAMPE, não só são capazes de reduzir a taxa de crescimento tumoral, como os animais submetidos ao tratamento não apresentaram quaisquer efeitos adversos.

No futuro deverão ser repetidos estes estudos, utilizando para tal um modelo animal heterotópico resultante da inoculação das células da linha celular Hep3B2.1-7. É importante clarificar *in vivo* qual é o comportamento destas células após administração dos hAMPE.

Uma vez que o ambiente tumoral deve ser o mais similar possível ao original, torna-se também importante realizar estudos *in vivo* que visem avaliar o efeito anti-cancerígeno dos hAMPE em modelos animais ortotópicos.

De forma geral, através dos resultados obtidos neste trabalho experimental, as células da linha celular HuH7 parecem ser as menos sensíveis ao tratamento com os hAMPE. Como já previamente mencionado, sabe-se que as linhas celulares em estudo possuem diferentes expressões de P53 (Brito et al. 2015; Gomes et al. 2015). Mutações nesta proteína podem resultar em tumores menos sensíveis à terapia, informação que pode provavelmente explicar a menor sensibilidade das células HuH7 ao tratamento com os hAMPE, uma vez que estas células sobre-expressam uma P53 mutada (Chan & Lung 2004). Por outro lado, também o aumento da expressão de MRP1 e de P21 induzida pelo tratamento com os hAMPE deverá contribuir para o aumento da resistência celular à terapia nas células da linha celular HuH7. Apesar dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* não serem particularmente animadores nas células HuH7, os promissores resultados obtidos na terapia combinada entre os hAMPE e os diferentes fármacos devem ser tidos em conta. Devido à falta de terapias adequadas para este tipo de tumores possuidores de uma P53 mutada, torna-se extremamente relevante entender o porquê dos ótimos resultados obtidos quando é efetuada a combinação dos hAMPE com o 5-FU, a doxorubicina, a cisplatina e o sorafenib.

A linha celular HepG2 parece ser a mais sensível ao tratamento com os hAMPE. A normal expressão de P53 nesta linha celular induz, possivelmente, ao correto reconhecimento dos danos e, conseqüentemente, à morte celular. Os resultados obtidos *in vivo* são extremamente animadores, uma vez que os hAMPE foram capazes de induzir uma regressão tumoral quase completa. Recentemente, Germanio et al. revelou que as HepG2 são muito sensíveis ao tratamento com meio condicionado derivado da membrana amniótica, provando assim a sua elevada sensibilidade à terapia com produtos derivados da membrana amniótica humana (Di Germanio et al. 2016).

Por último, e tendo apenas em conta os resultados *in vitro*, a linha celular Hep3B2.1-7 parece também ser sensível ao tratamento com os hAMPE. Uma vez que esta linha celular não expressa P53, seria de esperar que apresentasse elevada resistência ao tratamento. No entanto, tal não parece ocorrer. Os resultados por nós obtidos na terapia combinada são também bastante curiosos, particularmente no que diz respeito ao aparente antagonismo dos hAMPE com a cisplatina nesta linha celular. Fica por esclarecer ainda qual o comportamento *in vivo* da linha celular Hep3B2.1-7 após tratamento.

No contexto deste trabalho, há ainda muito por fazer relativamente à caracterização da membrana amniótica humana e, particularmente do hAMPE. Através de técnicas de proteómica e de lipidómica, é desejável que no futuro se fique a conhecer totalmente a composição do hAMPE pois só assim poderá ser possível entender totalmente os seus mecanismos de ação sobre as células cancerígenas. Mais do que o efeito do hAMPE como um todo, a descoberta de uma proteína ou lípido, ou um conjunto destes, capazes de mediar os efeitos anticancerígenos observados, poderia revolucionar a terapia do carcinoma hepatocelular.

Este estudo pioneiro revela, pela primeira vez, que a membrana amniótica enquanto tecido, considerando todos os seus constituintes, possui efeito anti-cancerígeno. Desta forma,

torna-se claro que os constituintes da matriz extracelular, e não só as hAECs e a hAMCs, poderão ser responsáveis pelos promissores resultados obtidos. No futuro é importante tentar identificar os verdadeiros responsáveis pelos efeitos anti-cancerígenos registados. Por outro lado, este estudo prova também que a utilização das membranas fetais, em particular da membrana amniótica, pode oferecer uma interessante alternativa terapêutica para o carcinoma hepatocelular humano.

Este trabalho experimental vem contribuir, de forma inegável, para a afirmação das características pro-apoptóticas da membrana amniótica humana. No entanto, tendo em consideração as restantes características deste tecido que se pensam estar envolvidas no processo anti-cancerígeno, vale a pena estudar no futuro o efeito anti-angiogénico e anti-inflamatório da membrana amniótica humana em modelos *in vitro* e *in vivo* de carcinoma hepatocelular humano.



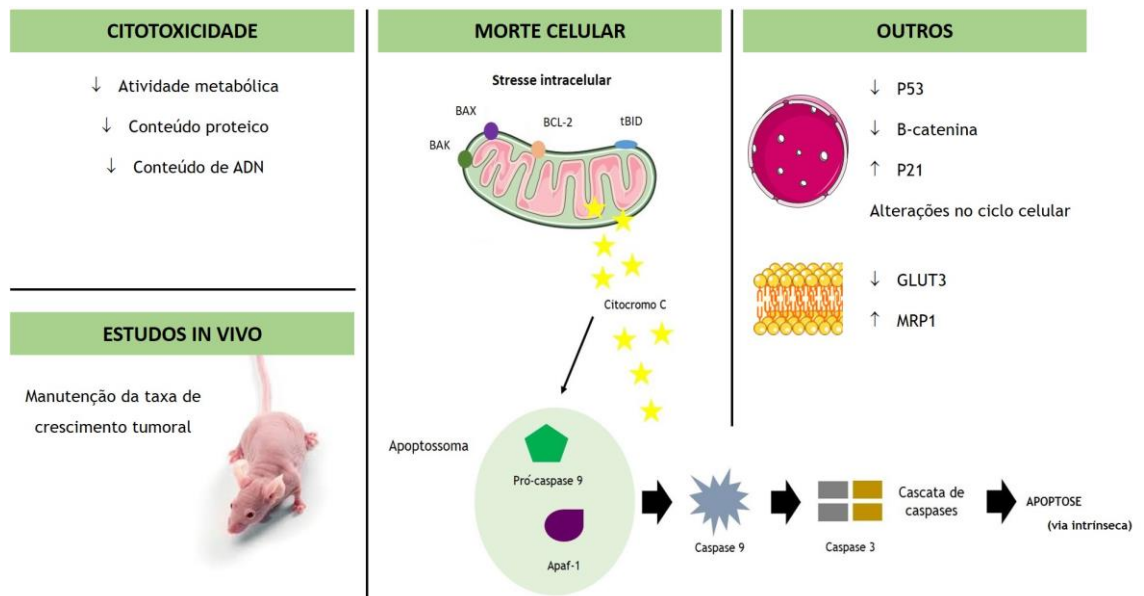
# Capítulo 6

## Conclusões



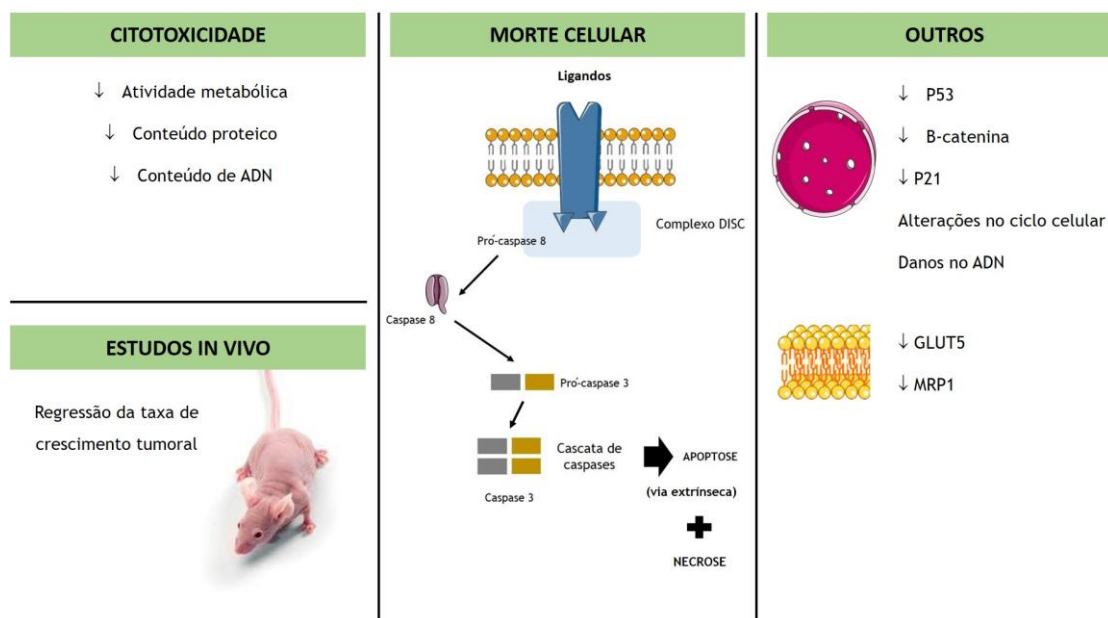
A utilização dos hAMPE como terapia na doença oncológica é uma ideia inovadora e este trabalho experimental oferece um importante contributo para o esclarecimento do papel anti-cancerígeno da membrana amniótica, em especial para a afirmação das suas propriedades pro-apoptóticas. De forma revolucionária, a membrana amniótica foi considerada na terapia anti-cancerígena enquanto tecido, evidenciando assim que os constituintes da matriz extracelular, e não só as hAECs e a hAMCs, poderão ser responsáveis pelo efeito pro-apoptótico registado. Este projeto experimental oferece ainda uma alternativa terapêutica para o carcinoma hepatocelular humano.

Desta forma, o trabalho experimental e a análise dos resultados obtidos permitiram concluir que os hAMPE foram capazes de induzir a citotoxicidade e a morte celular por apoptose nas células da linha celular HuH7, sendo esta mediada pela via intrínseca da apoptose, uma vez que se verificou o aumento da expressão da razão BAX/BCL2, do citocromo C, da caspase 9 e da caspase 3, tal como resumido na figura 6.1. A expressão da P53 e da  $\beta$ -catenina também diminuiu nas células da linha celular HuH7 após o tratamento, bem como a expressão do GLUT3. Infelizmente, os hAMPE parecem induzir resistência nas células da linha celular HuH7, uma vez que se verificou o aumento da MRP1 e da P21 e não se verificou qualquer dano no ADN. Através dos estudos *in vivo*, podemos concluir que os hAMPE foram incapazes de reduzir a taxa de crescimento tumoral nos xenotransplantes obtidos com células desta linha celular. Por outro lado, a terapia combinada dos hAMPE com o 5-FU, com a doxorrubicina, com a cisplatina e com o sorafenib parece ter um papel promissor no tratamento de tumores com mutações na P53, dos quais a linha celular HuH7 é um exemplo.



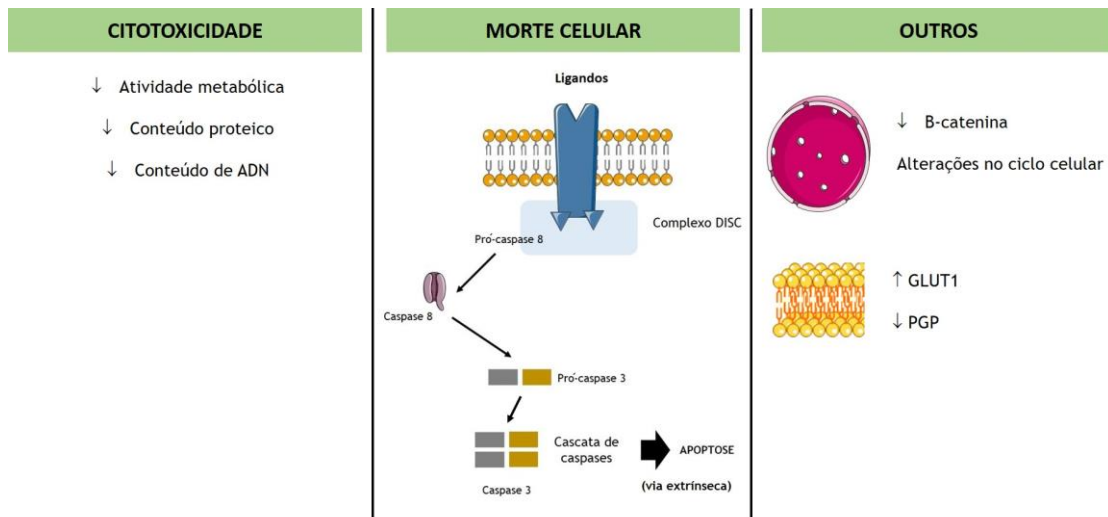
**Figura 6.1** - Efeitos *in vitro* e *in vivo* dos hAMPE nas células da linha celular HuH7. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Relativamente às células da linha celular HepG2, os hAMPE foram capazes de induzir a citotoxicidade e a morte celular por necrose e por apoptose nestas células. A apoptose é mediada pela via extrínseca pois verificou-se o aumento da expressão da caspase 8 e da caspase 3, tal como ilustrado na figura 6.2. O tratamento induziu danos no ADN e a desregulação do ciclo celular, bem como a diminuição da expressão da P53, da P21, da  $\beta$ -catenina, de GLUT5 e de MRP1. Através dos estudos *in vivo*, podemos concluir que os hAMPE foram capazes de induzir a regressão da taxa de crescimento tumoral nos xenotransplantes obtidos com células desta linha celular. A terapia combinada dos hAMPE com o 5-FU, com a doxorubicina, com a cisplatina e com o sorafenib parece ter um papel promissor no tratamento de tumores com normal expressão da P53, tal como as células da linha celular HepG2.



**Figura 6.2** - Efeitos *in vitro* e *in vivo* dos hAMPE nas células da linha celular HepG2. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Por último, verificou-se também que o tratamento com os hAMPE foi capaz de induzir a citotoxicidade e a morte celular por apoptose nas células da linha celular Hep3B2.1-7 através da via extrínseca, uma vez que se verificou o aumento da expressão da caspase 8 e da caspase 3. O tratamento foi, no entanto, incapaz de danificar o ADN. Por outro lado, os hAMPE induziram a diminuição da expressão da  $\beta$ -catenina e da PGP, tal como indicado na figura 6.3. Os hAMPE induziram o aumento da expressão do GLUT1 nas células da linha celular Hep3B2.1-7, bem como a desregulação do seu ciclo celular. A terapia combinada dos hAMPE com o sorafenib parece ter um papel promissor no tratamento de tumores com perfil similar às células da linha celular Hep3B2.1-7. Curiosamente, os hAMPE parecem antagonizar os efeitos da cisplatina neste tipo de células.



**Figura 6.3** - Efeitos *in vitro* dos hAMPE nas células da linha celular Hep3B2.1-7. Adaptado de Servier.com (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, disponível em <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Podemos referir ainda que o tratamento com os hAMPE parece apresentar citotoxicidade seletiva, uma vez que não ocorreu nenhuma alteração na atividade metabólica, no conteúdo proteico e no conteúdo de ADN das células de uma linha celular não tumorigénica.

Tendo em conta os resultados obtidos, o tratamento com os hAMPE parece ter um papel promissor na abordagem terapêutica do carcinoma hepatocelular. No entanto, os resultados revelaram claramente a importância da terapia personalizada, baseada no estudo do perfil característico dos tumores e na consequente prescrição de terapias personalizadas.

Este trabalho experimental veio confirmar o perfil pro-apoptótico da membrana amniótica humana. No futuro, é de inegável importância avaliar também o efeito anti-angiogénico e anti-inflamatório da membrana amniótica humana, usando para tal diversos modelos de carcinoma hepatocelular humano.



# Bibliografia



Abrantes, AM, JE Casalta-Lopes, and MF Botelho. "Biophysical Properties of Amniotic Membrane." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 41-56. *Springer Netherlands*, 2015.

Abrantes, AM, MES Serra, AC Gonçalves, J Rio, B Oliveiros, M Laranjo, AM Rocha-Gonsalves, AB Sarmento-Ribeiro, and MF Botelho. "Hypoxia-Induced Redox Alterations and Their Correlation with 99mTc-MIBI and 99mTc-HL-91 Uptake in Colon Cancer Cells." *Nuclear Medicine and Biology* 37, no. 2 (2010): 125-132.

Adinolfi, M, CA Akle, I McColl, AH Fensom, L Tansley, P Connolly, B-L Hsi, WP Faulk, P Travers, and WF Bodmer. "Expression of HLA Antigens, B2-Microglobulin and Enzymes by Human Amniotic Epithelial Cells." *Nature* 295, no. 5847 (1982): 325-327.

Ahsan, A, SM Hiniker, SG Ramanand, S Nyati, A Hedge, A Helman, R Menawat, MS Bhojani, TS Lawrence, and MK Nyati. "Role of EGFR Degradation in Cisplatin-Induced Cytotoxicity in Head and Neck Cancer." *Cancer Research* 70, no. 7 (2010): 2862-2869.

Al-Asmakh, M, H Race, S Tan, and MHF Sullivan. "The Effects of Oxygen Concentration on in Vitro Output of Prostaglandin E2 and Interleukin-6 from Human Fetal Membranes." *Molecular Human Reproduction* 13, no. 3 (2007): 197-201.

Alves, RCP, D Alves, B Guz, C Matos, M Viana, M Harriz, D Terrabuio, M Kondo, O Gampel, and P Polletti. "Advanced Hepatocellular Carcinoma: Review of Targeted Molecular Drugs." *Annals of Hepatology* 10, no. 1 (2011): 21-27.

Amann, T, and C Hellerbrand. "GLUT1 as a Therapeutic Target in Hepatocellular Carcinoma." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 13, no. 12 (2009): 1411-1427.

Amer, MI, and KH Abd-El-Maeboud. "Amnion Graft Following Hysteroscopic Lysis of Intrauterine Adhesions." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 32, no. 6 (2006): 559-566.

Amer, MI, KHI Abd-El-Maeboud, I Abdelfatah, FA Salama, and AS Abdallah. "Human Amnion as a Temporary Biologic Barrier after Hysteroscopic Lysis of Severe Intrauterine Adhesions: Pilot Study." *Journal of Minimally Invasive Gynecology* 17, no. 5 (2010): 605-611.

Areia, AL, and P Moura. "Amniotic Membrane in Health and Disease: An Obstetrical Perspective." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 77-101. *Springer Netherlands*, 2015.

Balkwill, F, and A Mantovani. "Inflammation and Cancer: Back to Virchow?" *The Lancet* 357, no. 9255 (2016): 539-545.

Baradaran-Rafii, A, H-R Aghayan, B Arjmand, and M-A Javadi. "Amniotic Membrane Transplantation." *Iranian Journal of Ophthalmic Research* 2, no. 1 (2007): 58-75.

Barros, JJS. "Embryology and Anatomy of Placental Membranes." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 3-18. *Springer Netherlands*, 2015.

Bataller, R, and DA Brenner. "Liver Fibrosis." *The Journal of Clinical Investigation* 115, no. 2 (2005): 209-218.

Behari, J. "The Wnt/B-Catenin Signaling Pathway in Liver Biology and Disease." *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 4, no. 6 (2010): 745-756.

Belmar-Lopez, C, G Mendoza, D Oberg, J Burnet, C Simon, I Cervello, M Iglesias, JC Ramirez, P Lopez-Larrubia, M Quintanilla, P Martin-Duque. "Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Used as Vehicles for Anti-Tumor Therapy Exert Different in Vivo Effects on Migration Capacity and Tumor Growth." *BMC Medicine* 11 (2013): 139.

Benson-Martin, J, P Zammaretti, G Bilic, T Schweizer, B Portmann-Lanz, T Burkhardt, R Zimmermann, and N Ochsenbein-Kölble. "The Young's Modulus of Fetal Preterm and Term Amniotic Membranes." *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 128, no. 1-2 (2006): 103-107.

Bernardi, P, V Petronilli, F Di Lisa, and M Forte. "A Mitochondrial Perspective on Cell Death." *Trends in Biochemical Sciences* 26, no. 2 (2001): 112-117.

Bilic, G, SM Zeisberger, AS Mallik, R Zimmermann, and AH Zisch. "Comparative Characterization of Cultured Human Term Amnion Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells for Application in Cell Therapy." *Cell Transplantation* 17, no. 8 (2008): 955-968.

Blonski, W, DS Kotlyar, and KA Forde. "Non-Viral Causes of Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology* 16, no. 29 (2010): 3603-3615.

Bosch, FX, J Ribes, M Díaz, and R Cléries. "Primary Liver Cancer: Worldwide Incidence and Trends." *Gastroenterology* 127, no. 5 (2004): S5-S16.

Bradley, G, and V Ling. "P-Glycoprotein, Multidrug Resistance and Tumor Progression." *Cancer and Metastasis Reviews* 13 (1994): 223-233.

Brandão, DF, LNZ Ramalho, FS Ramalho, S Zucoloto, ALC Martinelli, and OC Silva. "Liver Cirrhosis and Hepatic Stellate Cells." *Acta Cirúrgica Brasileira* 21, no. 1 (2006): 54-57.

Bressac, B, KM Galvin, TJ Liang, KJ Isselbacher, JR Wands, and M Ozturk. "Abnormal Structure and Expression of p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma." *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, no. 5 (1990): 1973-1977.

Brito, AF, AM Abrantes, C Pinto-Costa, AR Gomes, AC Mamede, J Casalta-Lopes, AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, JG Tralhão, and MF Botelho. "Hepatocellular Carcinoma and Chemotherapy: The Role of p53." *Chemotherapy* 58, no. 5 (2012): 381-386.

Brito, AF, AM Abrantes, M Ribeiro, R Oliveira, J Casalta-Lopes, AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, JG Tralhão, and MF Botelho. "Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose Uptake in Hepatocellular Carcinoma: Correlation with Glucose Transporters and p53 Expression." *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 5, no. 3 (2015): 183-189.

Brito, AF, M Mendes, AM Abrantes, JG Tralhão, and MF Botelho. "Positron Emission Tomography Diagnostic Imaging in Multidrug-Resistant Hepatocellular Carcinoma: Focus on 2-Deoxy-2-(18F)fluoro-D-Glucose." *Molecular Diagnosis & Therapy* 18, no. 5 (2014): 495-504.

Brito, AF, M Ribeiro, AM Abrantes, AC Mamede, M Laranjo, J Casalta-Lopes, AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, JG Tralhão, and MF Botelho. "New Approach for Treatment of Primary Liver Tumors: The Role of Quercetin." *Nutrition and Cancer* 4 (2016): 1-17.

Brito, AF. “GLUT-1: Um Alvo Terapêutico Para Os Tumores Primários Do Fígado?” *Universidade de Coimbra*, 2014.

Browne, JCM, and N Veall. “The Maternal Placental Blood Flow in Normotensive and Hypertensive Women.” *International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 60, no. 2 (1953): 141-147.

Bruix, J, and M Sherman. “Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update.” *Hepatology* 53, no. 3 (2011): 1020-1022.

Bruix, J, K-H Han, G Gores, JM Llovet, and V Mazzaferro. “Liver Cancer: Approaching a Personalized Care.” *Journal of Hepatology* 62, no. 15 (2015): S144-S156.

Bruix, J, L Boix, M Sala, and JM Llovet. “Focus on Hepatocellular Carcinoma.” *Cancer Cell* 5, no. 3 (March 2004): 215-219.

Bryant-Greenwood, GD. “The Extracellular Matrix of the Human Fetal Membranes: Structure and Function.” *Placenta* 19 (1998): 1-11.

Burd, LI, MD Jones, MA Simmons, EL Makowski, G Meschia, and FC Battaglia. “Placental Production and Foetal Utilisation of Lactate and Pyruvate.” *Nature* 254 (1975): 710-711.

Burden, DW. “Guide to the Homogenization of Biological Samples.” *Random Primers*, no. 7 (2008): 1-14.

Burgers, JK, RJ Nelson, DM Quinlan, and PC Walsh. “Nerve Growth Factor, Nerve Grafts and Amniotic Membrane Grafts Restore Erectile Function in Rats.” *The Journal of Urology* 146, no. 2 (1991): 463–468.

Cadwell, C, and GP Zambetti. “The Effects of Wild-Type p53 Tumor Suppressor Activity and Mutant p53 Gain-of-Function on Cell Growth.” *Gene* 277, no. 1-2 (2001): 15-30.

Cairns, RA, IS Harris, and TW Mak. “Regulation of Cancer Cell Metabolism.” *Nature Reviews: Cancer* 11, no. 2 (2011): 85-95.

Campbell, AGM, GS Dawes, AP Fishman, AI Hyman, and GB James. “The Oxygen Consumption of the Placenta and Foetal Membranes in the Sheep.” *Journal of Physiology* 182 (1966): 439-464.

Cao, J, Y Liu, L Jia, H-M Zhou, Y Kong, G Yang, L-P Jiang, Q-J Li, and L-F Zhong. “Curcumin Induces Apoptosis through Mitochondrial Hyperpolarization and mtDNA Damage in Human Hepatoma G2 Cells.” *Free Radical Biology and Medicine* 43 (2007): 968-975.

Cargnoni, A, M Di Marcello, M Campagnol, C Nassuato, A Albertini, and O Parolini. “Amniotic Membrane Patching Promotes Ischemic Rat Heart Repair.” *Cell Transplantation* 18, no. 10 (2009): 1147-1159.

Carr, BI. *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment*. Edited by BI Carr. 2nd ed. *Humana Press*, 2010.

Caruso, M, A Cargnoni, and O Parolini. “Stem Properties of Amniotic Membrane-Derived Cells.” In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 57-76. *Springer Netherlands*, 2015.

Caruso, M, A Silini, and O Parolini. “The Human Amniotic Membrane: A Tissue with Multifaceted Properties and Different Potential Clinical Applications.” In *Perinatal Stem Cells*,

edited by Kyle J Cetrulo, Curtis L Cetrulo Jr, and Rouzbeh R Taghizadeh, 2nd ed., 177-195. *Wiley-Blackwell*, 2013.

Carvalho, MJ. "Amniotic Membrane in Gynaecology." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by ACMamede and MFBotelho, 1st ed., 165-175. *Springer Netherlands*, 2015.

Casalta-Lopes, J, AM Abrantes, M Laranjo, J Rio, AC Gonçalves, B Oliveiros, AB Sarmiento-Ribeiro, and MF Botelho. "Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine." *Journal of Cancer Therapy 02* (2011): 408-417.

Cayrol, C, M Knibiehler, and B Ducommun. "p21 Binding to PCNA Causes G1 and G2 Cell Cycle Arrest in p53-Deficient Cells." *Oncogene 16*, no. 3 (1998): 311-320.

Cervello, M, D Bachvarov, N Lampiasi, A Cusimano, A Azzolina, JA McCubrey, and G Montalto. "Molecular Mechanisms of Sorafenib Action in Liver Cancer Cells." *Cell Cycle 11*, no. 15 (2012): 2843-2855.

Cevik, IU, and T Dalkara. "Intravenously Administered Propidium Iodide Labels Necrotic Cells in the Intact Mouse Brain after Injury." *Cell Death and Differentiation 10*, no. 8 (2003): 928-929.

Chan, K-T, and ML Lung. "Mutant p53 Expression Enhances Drug Resistance in a Hepatocellular Carcinoma Cell Line." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology 53*, no. 6 (2004): 519-526.

Chen, C, and G Wang. "Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma and Challenges and Opportunities for Molecular Targeted Therapy." *World Journal of Hepatology 7*, no. 15 (2015): 1964-1970.

Chen, C-J, H-I Yang, J Su, C-L Jen, S-L You, S-N Lu, G-T Huang, and YH Iloeje. "Risk of Hepatocellular Carcinoma across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level." *JAMA: The Journal of the American Medical Association 295*, no. 1 (2006): 65-73.

Choi, K, J Kim, GW Kim, and C Choi. "Oxidative Stress-Induced Necrotic Cell Death via Mitochondria-Dependent Burst of Reactive Oxygen Species." *Current Neurovascular Research 6*, no. 4 (2009): 213-222.

Chopra, A, and BS Thomas. "Amniotic Membrane: A Novel Material for Regeneration and Repair." *Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering 18*, no. 1 (2013): 1-8.

Chou, T-C. "Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method." *Cancer Research 70*, no. 2 (2010): 440-446.

Chuang, S-C, CL Vecchia, and P Boffetta. "Liver Cancer: Descriptive Epidemiology and Risk Factors Other than HBV and HCV Infection." *Cancer Letters 286*, no. 1 (2009): 9-14.

Collins, AR, AA Oscoz, G Brunborg, I Gaivão, L Giovannelli, M Kruszewski, CC Smith, and R Štětina. "The Comet Assay: Topical Issues." *Mutagenesis 23*, no. 3 (2008): 143-151.

Collins, AR, VL Dobson, M Dušinská, G Kennedy, and R Štětina. "The Comet Assay: What Can It Really Tell Us?" *Mutation Research 375*, no. 2 (1997): 183-193.

Collins, JA, CA Schandi, KK Young, J Vesely, and MC Willingham. "Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45, no. 7 (1997): 923-934.

Corradetti, B, A Meucci, D Bizzaro, F Cremonesi, and AL Consiglio. "Mesenchymal Stem Cells from Amnion and Amniotic Fluid in the Bovine." *Reproduction* 145, no. 4 (2013): 391-400.

Cossarizza, A, M Baccarani-Contri, G Kalashnikova, and C Franceschi. "A New Method for the Cytofluorimetric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using the J-Aggregate Forming Lipophilic Cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1 (1993): 40-45.

Costa, E, and JN Murta. "Amniotic Membrane in Ophthalmology." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 105-122. *Springer Netherlands*, 2015.

Costanzo, F, MA Bevilacqua, M Giordano, and F Cimino. "Expression of Genes of Ferritin Subunits in Human Hepatoma Cell Lines." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161, no. 2 (1989): 902-909.

Coussens, LM, and Z Werb. "Inflammation and Cancer." *Nature* 420, no. 6917 (2002): 860-867.

Crissman, HA, and JA Steinkamp. "Rapid, Simultaneous Measurement of DNA, Protein and Cell Volume in Single Cells from Large Mammalian Cell Populations." *The Journal of Cell Biology* 59, no. 3 (1973): 766-771.

Dagrosa, MA, M Viaggi, J Longhino, O Calzetta, R Cabrini, M Edreira, G Juvenal, and MA Pisarev. "Experimental Application of Boron Neutron Capture Therapy to Undifferentiated Thyroid Carcinoma." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 57, no. 4 (2003): 1084-1092.

Danaei, G, SV Hoorn, AD Lopez, CJL Murray, and M Ezzati. "Causes of Cancer in the World: Comparative Risk Assessment of Nine Behavioural and Environmental Risk Factors." *The Lancet* 366 (2005): 1784-1793.

Davis, JW. "Skin Transplantation with a Review of 550 Cases at the Johns Hopkins Hospital." *Johns Hopkins Medical Journal* 15 (1910): 307.

Dent, R, M Trudeau, KI Pritchard, WM Hanna, HK Kahn, CA Sawka, LA Lickley, E Rawlinson, P Sun, and SA Narod. "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence." *Clinical Cancer Research* 13, no. 15 (2007): 4429-4434.

Dhall, K. "Amnion Graft for Treatment of Congenital Absence of the Vagina." *International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 91, no. 3 (1984): 279-282.

Di Germanio, C, M Bernier, M Petr, M Mattioli, B Barboni, and R de Cabo. "Conditioned Medium Derived from Rat Amniotic Epithelial Cells Confers Protection against Inflammation, Cancer, and Senescence." *Oncotarget*, May (2016).

Díaz-Prado, S, ME Rendal-Vázquez, E Muiños-López, T Hermida-Gómez, M Rodríguez-Cabarcos, I Fuentes-Boquete, FJ de Toro, FJ Blanco "Potential Use of the Human Amniotic

Membrane as a Scaffold in Human Articular Cartilage Repair.” *Cell and Tissue Banking* 11, no. 2 (May 2010): 183-195.

Dua, HS, and A Azuara-Blanco. “Amniotic Membrane Transplantation.” *British Journal of Ophthalmology* 83 (1999): 748-752.

Dudek, H, DH Wong, R Arvan, A Shah, K Wortham, B Ying, R Diwanji, W Zhou, B Holmes, H Yang, WA Cyr, Y Zhou, A Shah, R Farkiwala, M lee, Y Li, GR rettig, MA Collingwood, SK Basu, MA Bahlke, BD Brown. “Knockdown of  $\beta$ -Catenin with Dicer-Substrate siRNAs Reduces Liver Tumor Burden in Vivo.” *Molecular Therapy* 22, no. 1 (2014): 92-101.

Edinger, AL, and CB Thompson. “Death by Design: Apoptosis, Necrosis and Autophagy.” *Current Opinion in Cell Biology* 16, no. 6 (2004): 663-669.

Elmore, S. “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.” *Toxicologic Pathology* 35, no. 4 (2007): 495-516.

El-Serag, HB. “Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma.” *Gastroenterology* 142, no. 6 (2012): 1264-1273.

Engeland, M van, LJQ Nieland, F CS Ramaekers, B Schutte, and CPM Reutelingsperger. “A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure.” *Cytometry* 31 (1998): 1-9.

Evangelista, M, M Soncini, and O Parolini. “Placenta-Derived Stem Cells: New Hope for Cell Therapy?” *Cytotechnology* 58, no. 1 (2008): 33-42.

Fabregat, I. “Dysregulation of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells.” *World Journal of Gastroenterology* 15 (2009): 513-520.

Fairbairn, DW, PL Olive, and KL O’Neill. “The Comet Assay: A Comprehensive Review.” *Mutation Research* 339, no. 1 (1995): 37-59.

Farazi, PA, and RA DePinho. “Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: From Genes to Environment.” *Nature Reviews: Cancer* 6, no. 9 (2006): 674-687.

Fatimah, SS, GC Tan, K Chua, MMN Fariha, AE Tan, and AR Hayati. “Stemness and Angiogenic Gene Expression Changes of Serial-Passage Human Amnion Mesenchymal Cells.” *Microvascular Research* 86 (2013): 21-29.

Fattovich, G, and JM Llovet. “Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in HCV-Cirrhosis: What We Know and What Is Missing.” *Journal of Hepatology* 44 (2006): 1013-1016.

Favaloro, B, N Allocati, V Graziano, C Di Ilio, and V De Laurenzi. “Role of Apoptosis in Disease.” *Aging* 4, no. 5 (2012): 330-349.

Ferlay, J, E Steliarova-Foucher, J Lortet-Tieulent, S Rosso, JWW Coebergh, H Comber, D Forman, and F Bray. “Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012.” *European Journal of Cancer* 49, no. 6 (2013): 1374-1403.

Ferlay, J, I Soerjomataram, M Ervik, R Dikshit, S Eser, C Mathers, M Rebelo, DM Parkin, D Forman, and F Bray. “GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N. 11.” *International Agency for Research on Cancer*, 2013.

Fernandes, AI, JG Tralhão, A Abrantes, E Hoti, H Alexandrino, B Oliveiros, M Ferreira, MF Botelho, and FC Sousa. "Functional Hepatocellular Regeneration in Elderly Patients Undergoing Hepatectomy." *Liver International*, no. 2 (2014): 1-8.

Fernandes, M, MS Sridhar, VS Sangwan, and GN Rao. "Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction." *Cornea* 24, no. 6 (2005): 643-653.

Ferng, AS, KM Marsh, TR Pilikian, A Connell, C Hemphill, S Paidy, R Runyan, J Konhilas, and Z Khalpey. "Human Amniotic Membrane Promotes Antimicrobial Microenvironment in a Device-Related Infection." *Journal of Biomedical Science and Engineering* 9 (2016): 122-126.

Ferreira, CG, C Tolis, and G Giaccone. "P53 and Chemosensitivity." *Annals of Oncology* 10, no. 9 (1999): 1011-1021.

Ferreira, MM, and EVP Carrilho. "Amniotic Membrane in Oral Medicine." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 153-163. *Springer Netherlands*, 2015.

Florea, A-M, and D Büsselberg. "Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects." *Cancers* 3, no. 4 (2011): 1351-1371.

Foster, HW, and SK Das. "Study of Lipids in Human Amnion and Chorion." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 149, no. 6 (1984): 670-673.

Fotopoulou, C, J Sehouli, N Gehrman, I Schoenborn, and W Lichtenegger. "Functional and Anatomic Results of Amnion Vaginoplasty in Young Women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome." *Fertility and Sterility* 94, no. 1 (2010): 317-323.

Friedman, SL. "Mechanisms of Hepatic Fibrosis." *Gastroenterology* 134, no. 6 (2008): 1655-1669.

Furuse, J. "Sorafenib for the Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma." *Biologics: Targets & Therapy* 2, no. 4 (2008): 779-788.

Ganguly, A, S Basu, P Chakraborty, S Chatterjee, A Sarkar, M Chatterjee, and SK Choudhuri. "Targeting Mitochondrial Cell Death Pathway to Overcome Drug Resistance with a Newly Developed Iron Chelate." *PLOS ONE* 5, no. 6 (2010): e11253.

Georgiou, CD, I Papapostolou, and K Grintzalis. "Protocol for the Quantitative Assessment of DNA Concentration and Damage (Fragmentation and Nicks)." *Nature Protocols* 4, no. 2 (2009): 125-131.

Gewirtz, DA. "A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin." *Biochemical Pharmacology* 57, no. 7 (1999): 727-741.

Giglia, JL, SJ Antonia, LB Berk, S Bruno, S Dessureault, and SE Finkelstein. "Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Past, Present, and Future." *Cancer Control* 17, no. 2 (2010): 120-129.

Gogvadze, V, S Orrenius, and B Zhivotovsky. "Multiple Pathways of Cytochrome c Release from Mitochondria in Apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, no. 5-6 (2006): 639-647.

Goldberg, S. "Mechanical/physical Methods of Cell Disruption and Tissue Homogenization." In *Methods in Molecular Biology*, edited by Anton Posch, 424:3-22. *Humana Press*, 2008.

Gomaa, AI, SA Khan, MB Toledano, I Waked, and SD Taylor-Robinson. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Risk Factors and Pathogenesis." *World Journal of Gastroenterology* 14, no. 27 (2008): 4300-4308.

Gomes, A, E Fernandes, and JLFC Lima. "Fluorescence Probes Used for Detection of Reactive Oxygen Species." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65, no. 2-3 (2005): 45-80.

Gomes, AR, AM Abrantes, AF Brito, M Laranjo, JE Casalta-Lopes, AC Gonçalves, AB Sarmiento-Ribeiro, MF Botelho, and JG Tralhão. "Influence of P53 on the Radiotherapy Response of Hepatocellular Carcinoma." *Clinical and Molecular Hepatology* 21 (2015): 257-267.

Gomes, JA, A Romano, MS Santos, and HS Dua. "Amniotic Membrane Use in Ophthalmology." *Current Opinion in Ophthalmology* 16, no. 4 (2005): 233-240.

Gomes, MA, DG Priolli, JG Tralhão, and MF Botelho. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Biology, Diagnosis and Therapies." *Revista Da Associação Médica Brasileira* 59, no. 5 (2013): 514-524.

Gonçalves, AC, A Barbosa-Ribeiro, V Alves, T Silva, and AB Sarmiento-Ribeiro. "Selenium Compounds Induced ROS-Dependent Apoptosis in Myelodysplasia Cells." *Biological Trace Element Research* 154, no. 3 (2013): 440-447.

González-Polo, R-A, P Boya, A-L Pauleau, Abdelali Jalil, N Larochette, S Souquère, E-L Eskelinen, G Pierron, P Saftig, and G Kroemer. "The Apoptosis/autophagy Paradox: Autophagic Vacuolization before Apoptotic Death." *Journal of Cell Science* 118, no. 14 (2005): 3091-3102.

Goodman, ZD. "Neoplasms of the Liver." *Modern Pathology* 20, no. 2006 (March 2007): S49-60.

Grabski, AC. "Advances in Preparation of Biological Extracts for Protein Purification." *Methods in Enzymology* 463 (2009): 285-303.

Grivicich, I, A Regner, and AB da Rocha. "Apoptosis:programmed Cell Death." *Revista Brasileira de Cancerologia* 53, no. 3 (2007): 335-343.

Gude, NM, CT Roberts, B Kalionis, and RG King. "Growth and Function of the Normal Human Placenta." *Thrombosis Research* 114, no. 5-6 (2004): 397-407.

Gude, NM, JL Stevenson, P Murthi, S Rogers, and JD Best. "Expression of GLUT12 in the Fetal Membranes of the Human Placenta." *Placenta* 26 (2005): 67-72.

Gude, NM, JL Stevenson, S Rogers, JD Best, B Kalionis, MA Huisman, JJHM Erwich, A Timmer, and RG King. "GLUT12 Expression in Human Placenta in First Trimester and Term." *Placenta* 24, no. 5 (2003): 566-570.

Gunasegaram, R, KL Peh, A Loganath, SC Ng, SR Kottegoda, and SS Ratnam. "Cholesterol Synthesizing Enzymes in Term Human Fetal Amnion." *Journal of Perinatal Medicine* 13, no. 3 (1985): 143–146.

Halim, AS, E Bujang-Safawi, and AZM Saad. "Amniotic Membrane in the Treatment of Burns." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 123-137. *Springer Netherlands*, 2015.

Han, YP. "Matrix Metalloproteinases, the Pros and Cons, in the Liver Fibrosis." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21, no. Suppl 3 (2006): S88-91.

Hanahan, A, Weinberg, RA . "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (2000): 57-70.

Hanahan, D, and RA Weinberg. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144, no. 5 (2011): 646-674.

Hao, Y, DH Ma, DG Hwang, WS Kim, and F Zhang. "Identification of Antiangiogenic and Antiinflammatory Proteins in Human Amniotic Membrane." *Cornea* 19, no. 3 (May 2000): 348-352.

Hartmann, A, and G Speit. "The Contribution of Cytotoxicity to DNA-Effects in the Single Cell Gel Test (Comet Assay)." *Toxicology Letters* 90, no. 2-3 (1997): 183-188.

Hedley, DW, and S Chow. "Evaluation of Methods for Measuring Cellular Glutathione Content Using Flow Cytometry." *Cytometry* 15, no. 4 (1994): 349-358.

Herrmann, U, P Degiampietro, E Metzger, C Bachmann, and E Peheim. "Activities in the Placenta and Fetal Membranes of Enzymes Involved in Energy Metabolism." *Archives of Gynecology* 236, no. 4 (1985): 249-254.

Higa, K, S Shimmura, J Shimazaki, and K Tsubota. "Hyaluronic Acid-CD44 Interaction Mediates the Adhesion of Lymphocytes by Amniotic Membrane Stroma." *Cornea* 24, no. 2 (2005): 206-212.

Hopkinson, A, RS McIntosh, V Shanmuganathan, PJ Tighe, and HS Dua. "Proteomic Analysis of Amniotic Membrane Prepared for Human Transplantation: Characterization of Proteins and Clinical Implications." *Journal of Proteome Research* 5, no. 9 (2006): 2226-2235.

Houghton, P, R Fang, I Techatanawat, G Steventon, PJ Hylands, and CC Lee. "The Sulphorhodamine (SRB) Assay and Other Approaches to Testing Plant Extracts and Derived Compounds for Activities Related to Reputed Anticancer Activity." *Methods* 42, no. 4 (2007): 377-387.

Hsieh, JL, CL Wu, CH Lee, and AiL Shiau. "Hepatitis B Virus X Protein Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Cytolysis Induced by E1B-Deleted Adenovirus through the Disruption of p53 Function." *Clinical Cancer Research* 9, no. 1 I (2003): 338-345.

Hussain, SP, J Schwank, F Staib, XW Wang, and CC Harris. "TP53 Mutations and Hepatocellular Carcinoma: Insights into the Etiology and Pathogenesis of Liver Cancer." *Oncogene* 26, no. 15 (2007): 2166-2176.

In 't Anker, PS, SA Scherjon, C Kleijburg-van der Keur, GMJS de Groot-Swings, FHJ Claas, WE Fibbe, and HHH Kanhai. "Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta." *Stem Cells* 22, no. 7 (2004): 1338-1345.

Insausti, CL, M Blanquer, AM Garcia-Hernández, G Castellanos, and JM Moraleda. "Amniotic Membrane-Derived Stem Cells: Immunomodulatory Properties and Potential Clinical Application." *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 7 (2014): 53-63.

Ioannou, YA, and FW Chen. "Quantitation of DNA Fragmentation in Apoptosis." *Nucleic Acids Research* 24, no. 5 (1996): 992-993.

Jiang, H, H Wang, Z Tan, S Hu, H Wang, B Shi, L Yang, P Li, J Gu, H Wang, Z Li. "Growth Suppression of Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts by a Monoclonal Antibody CH12 Directed to Epidermal Growth Factor Receptor Variant III." *The Journal of Biological Chemistry* 286, no. 7 (2011): 5913-5920.

Jiao, H, F Guan, B Yang, J Li, L Song, X Hu, and Y Du. "Human Amniotic Membrane Derived-Mesenchymal Stem Cells Induce C6 Glioma Apoptosis in Vivo through the Bcl-2/caspase Pathways." *Molecular Biology Reports* 39, no. 1 (2012): 467-473.

Jin, CZ, SR Park, BH Choi, K-Y Lee, CK Kang, and B-H Min. "Human Amniotic Membrane as a Delivery Matrix for Articular Cartilage Repair." *Tissue Engineering* 13, no. 4 (2007): 693-702.

Johnson, CR, and WD Jarvis. "Caspase-9 Regulation: An Update." *Apoptosis* 9, no. 4 (2004): 423-427.

Johnson, PJ. "Systemic Chemotherapy of Liver Tumors." *Seminars in Surgical Oncology* 19, no. 2 (2000): 116-124.

Kamiya, K, M Wang, S Uchida, S Amano, T Oshika, N Sakuragawa, and J Hori. "Topical Application of Culture Supernatant from Human Amniotic Epithelial Cells Suppresses Inflammatory Reactions in Cornea." *Experimental Eye Research* 80, no. 5 (2005): 671-679.

Kanayama, N, T Terao, Y Kawashima, K Horiuchi, and D Fujimoto. "Collagen Types in Normal and Prematurely Ruptured Amniotic Membranes." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 153, no. 8 (1985): 899-903.

Kang, N-H, BO-R Yi, SY Lim, KA Hwang, YS Baek, KS Kang, and KC Choi. "Human Amniotic Membrane-Derived Epithelial Stem Cells Display Anticancer Activity in BALB/c Female Nude Mice Bearing Disseminated Breast Cancer Xenografts." *International Journal of Oncology* 40, no. 6 (2012): 2022-2028.

Kang, N-H, K-A Hwang, SU Kim, Y-B Kim, S-H Hyun, E-B Jeung, and K-C Choi. "Potential Antitumor Therapeutic Strategies of Human Amniotic Membrane and Amniotic Fluid-Derived Stem Cells." *Cancer Gene Therapy* 19, no. 8 (2012): 517-522.

Kesting, MR, K-D Wolff, CP Nobis, and NH Rohleder. "Amniotic Membrane in Oral and Maxillofacial Surgery." *Oral and Maxillofacial Surgery* 18 (2014): 153-164.

Khalpey, Z, KM Marsh, A Ferng, IB Riaz, M Friedman, J Indik, R Avery, C Jokerst, and I Oliva. "First in Man: Amniotic Patch Reduces Postoperative Inflammation." *The American Journal of Medicine* 128, no. 1 (2015): e5-e6.

Kim, J, HM Kang, H Kim, MR Kim, HC Kwon, MC Gye, SG Kang, HS Yang, and J You. "Ex Vivo Characteristics of Human Amniotic Membrane-Derived Stem Cells." *Cloning and Stem Cells* 9, no. 4 (2007): 581-594.

Kim, JC, and SC Tseng. "Transplantation of Preserved Human Amniotic Membrane for Surface Reconstruction in Severely Damaged Rabbit Corneas." *Cornea* 14, no. 5 (1995): 473-484.

Kim, S-H, SH Bang, SY Kang, KD Park, JH Eom, IU Oh, SH Yoo, C-W Kim, and SY Baek. "Human Amniotic Membrane-Derived Stromal Cells (hAMSC) Interact Depending on Breast Cancer Cell Type through Secreted Molecules." *Tissue and Cell* 47, no. 1 (2015): 10-16.

King, B. "Distribution and Characterization of Anionic Sites in the Basal Lamina of Developing Human Amniotic Epithelium." *Anatomical Record* 212, no. 1 (1985): 57-62.

King, BF. "Developmental Changes in the Fine Structure of Rhesus Monkey Amnion." *American Journal of Anatomy* 157, no. 3 (1980): 285-307.

Klaunig, JE, LM Kamendulis, and BA Hocevar. "Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis." *Toxicologic Pathology* 38, no. 1 (2010): 96-109.

Koizumi, N, T Inatomi, C Sotozono, NJ Fullwood, AJ Quantock, and S Kinoshita. "Growth Factor mRNA and Protein in Preserved Human Amniotic Membrane." *Current Eye Research* 20, no. 3 (2000): 173-177.

Koob, TJ, R Rennert, N Zabek, M Masee, JJ Lim, JS Temenoff, WW Li, and G Gurtner. "Biological Properties of Dehydrated Human Amnion/chorion Composite Graft: Implications for Chronic Wound Healing." *International Wound Journal* 10, no. 5 (2013): 493-500.

Krishan, A. "Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining." *The Journal of Cell Biology* 66 (1975): 188-193.

Krizhanovsky, V, M Yon, RA Dickins, S Hearn, J Simon, C Miething, H Yee, L Zender, and SW Lowe. "Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis." *Cell* 134, no. 4 (2008): 657-667.

Kruidering, M, and GI Evan. "Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning Of 'the End'?" *IUBMB Life* 50, no. 2 (2000): 85-90.

Kupcsik, L. "Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: The MTT Reduction Assay." In *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols - Methods in Molecular Biology*, edited by MJ Stoddart, 13-19. *Humana Press*, 2011.

Lane, DP, CF Cheok, and S Lain. "p53-Based Cancer Therapy." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, no. 9 (2010): 1-24.

Laranjo, M. "Preservation of Amniotic Membrane." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 209-230. *Springer Netherlands*, 2015.

Layne, E. "Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins." *Methods in Enzymology* 3, no. C (1957): 447-454.

Leazer, TM, and CD Klaassen. "The Presence of Xenobiotic Transporters in Rat Placenta." *Drug Metabolism and Disposition* 31, no. 2 (2003): 153-167.

Lee, T, T Lau, and I Ng. "Doxorubicin-Induced Apoptosis and Chemosensitivity in Hepatoma Cell Lines." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 49, no. 1 (2002): 78-86.

Li, Y, and HE Schellhorn. "New Developments and Novel Therapeutic Perspectives for Vitamin C." *The Journal of Nutrition* 137, no. 10 (2007): 2171-2184.

Lin, JS, L Zhou, A Sagayaraj, NHB Jumat, M Choolani, JKY Chan, A Biswas, PC Wong, SG Lim, and YY Dan. "Hepatic Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells and in Vivo Therapeutic Effect on Animal Model of Cirrhosis." *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2015.

Lin, T, and MS Yang. "Benzo[a]pyrene-Induced Necrosis in the HepG2 Cells via PARP-1 Activation and NAD<sup>+</sup> Depletion." *Toxicology* 245, no. 1-2 (2008): 147-153.

Liu, L, Y Cao, C Chen, X Zhang, A McNabola, D Wilkie, S Wilhelm, M Lynch, and C Carter. "Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5." *Cancer Research* 66, no. 24 (2006): 11851-11858.

Liu, R, HI Wettersten, S-H Park, and RH Weiss. "Small-Molecule Inhibitors of p21 as Novel Therapeutics for Chemotherapy-Resistant Kidney Cancer." *Future Medicinal Chemistry* 5, no. 9 (2013): 991-994.

Liu, T, H Zhai, Y Xu, Y Dong, Y Sun, X Zang, and J Zhao. "Amniotic Membrane Traps and Induces Apoptosis of Inflammatory Cells in Ocular Surface Chemical Burn." *Molecular Vision*, no. 18 (2012): 2137-2146.

Longley, DB, DP Harkin, and PG Johnston. "5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies." *Nature Reviews: Cancer* 3, no. 5 (2003): 330-338.

Lopes, A, M Grãos, and A Paiva. "Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Amniotic Membrane." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 195-207. *Springer Netherlands*, 2015.

Louis, KS, and AC Siegel. "Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods." In *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols - Methods in Molecular Biology*, edited by MJ Stoddart, 7-12. *Humana Press*, 2011.

Macleod, KF, N Sherry, G Hannon, D Beach, T Tokino, K Kinzler, B Vogelstein, and T Jacks. "p53-Dependent and Independent Expression of p21 during Cell Growth, Differentiation, and DNA Damage." *Genes and Development* 9, no. 8 (1995): 935-944.

Magatti, M, S De Munari, E Vertua, and O Parolini. "Amniotic Membrane-Derived Cells Inhibit Proliferation of Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16, no. 9 (January 2012): 2208-22018.

Malak, TM, CD Ockleford, SC Bell, R Dalgleish, N Bright, and J Macvicar. "Confocal Immunofluorescence Localization of Collagen Types I, III, IV, V and VI and Their Ultrastructural Organization in Term Human Fetal Membranes." *Placenta* 14 (1993): 385-406.

Malek, A, R Sager, HJ Altermatt, D Gaeng, R Leiser, and H Schneider. "Glucose Consumption and Lactate Production of Human Placental Tissue under Different Conditions of in Vitro Incubation." *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 3 (1996): 113-120.

Malhi, H, ME Guicciardi, and GJ Gores. "Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger." *Physiological Reviews* 90, no. 3 (2010): 1165-1194.

Mamede, AC, AS Pires, and AF Brito. "Amniotic Membrane in Cancer." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, I., 8:139-152. *Springer Netherlands*, 2015.

Mamede, AC, M Laranjo, MJ Carvalho, AM Abrantes, AS Pires, AF Brito, P Moura, CJ Maia, and MF Botelho. "Effect of Amniotic Membrane Proteins in Human Cancer Cell Lines: An Exploratory Study." *The Journal of Membrane Biology* 247, no. 4 (2014): 357-360.

Mamede, AC, MJ Carvalho, AM Abrantes, M Laranjo, CJ Maia, and MF Botelho. "Amniotic Membrane: From Structure and Functions to Clinical Applications." *Cell and Tissue Research* 349, no. 2 (2012): 447-458.

Mamede, AC, S Guerra, M Laranjo, K Santos, MJ Carvalho, T Carvalheiro, P Moura, A Paiva, AM Abrantes, CJ Maia, MF Botelho. "Oxidative Stress, DNA, Cell Cycle/cell Cycle Associated Proteins and Multidrug Resistance Proteins: Targets of Human Amniotic Membrane in Hepatocellular Carcinoma." *Pathology Oncology Research*, March (2016).

Mamede, AC, S Guerra, M Laranjo, MJ Carvalho, RC Oliveira, AC Gonçalves, R Alves, L Prado Castro, AB Sarmento-Ribeiro, P Moura, AM Abrantes, CJ Maia, MF Botelho. "Selective Cytotoxicity and Cell Death Induced by Human Amniotic Membrane in Hepatocellular Carcinoma." *Medical Oncology* 32, no. 12 (2015): 257.

Manuelpillai, U, D Lourensz, V Vaghjiani, J Tchongue, D Lacey, JY Tee, P Murthi, J Chan, A Hodge, and A Sievert. "Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation Induces Markers of Alternative Macrophage Activation and Reduces Established Hepatic Fibrosis." *PLOS ONE* 7, no. 6 (2012): 1-11.

Manuelpillai, U, J Tchongue, D Lourensz, V Vaghjiani, CS Samuel, A Liu, ED Williams, and W Sievert. "Transplantation of Human Amnion Epithelial Cells Reduces Hepatic Fibrosis in Immunocompetent CCl<sub>4</sub>-Treated Mice." *Cell Transplantation* 19, no. 9 (2010): 1157-1168.

Many, A, L Schreiber, S Rosner, JB Lessing, A Eldor, and MJ Kupfermanc. "Pathologic Features of the Placenta in Women with Severe Pregnancy Complications and Thrombophilia." *Obstetrics & Gynecology* 98, no. 6 (2001).

Marongiu, F, R Gramignoli, K Dorko, T Miki, AR Ranade, MP Serra, S Doratiotto, M Sini, S Sharma, K Mitamura, TL Sellaro, V Tahan, KJ Skyvorak, ECS Ellis, SF Badylak, JC Davila, R Hines, E Laconi, SC Strom. "Hepatic Differentiation of Amniotic Epithelial Cells." *Hepatology* 53, no. 5 (2011): 1719-1729.

Marra, M, IM Sordelli, A Lombardi, M Lamberti, L Tarantino, A Giudice, P Stiuso, A Abbruzzese, R Sperlongano, M Accardo, M Agresti, M Caraglia, P Sperlongano. "Molecular Targets and Oxidative Stress Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: An Overview." *Journal of Translational Medicine* 9, no. 1 (2011): 171.

Martínez-Maqueda, D, B Hernández-Ledesma, L Amigo, B Miralles, and JA Gómez-Ruiz. "Extraction/fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion." In

Proteomics in Foods: Principles and Applications, edited by F Toldrá and LML Nollet, 21-50. Springer US, 2013.

Martinou, JC, S Desagher, and B Antonsson. "Cytochrome c Release from Mitochondria: All or Nothing." *Nature Cell Biology* 2, no. 3 (2000): E41-E43.

Marvin, KW, JA Keelan, RL Eykholt, TA Sato, and MD Mitchell. "Use of cDNA Arrays to Generate Differential Expression Profiles for Inflammatory Genes in Human Gestational Membranes Delivered at Term and Preterm." *Molecular Human Reproduction* 8, no. 4 (2002): 399-408.

Mazitschek, R, and A Giannis. "Inhibitors of Angiogenesis and Cancer-Related Receptor Tyrosine Kinase." *Current Opinion in Chemical Biology* 8, no. 4 (2004): 432-441.

Mazzanti, R, L Gramantieri, and L Bolondi. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Clinical Aspects." *Molecular Aspects of Medicine* 29, no. 1-2 (2008): 130-143.

McIlwain, DR, T Berger, and TW Mak. "Caspase Functions in Cell Death and Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2013): 1-28.

Mencucci, R, I Paladini, U Menchini, JJ Gicquel, and R Dei. "Inhibition of Viral Replication in Vitro by Antiviral-Treated Amniotic Membrane. Possible Use of Amniotic Membrane as Drug-Delivering Tool." *British Journal of Ophthalmology* 95, no. 1 (2011): 28-31.

Mencucci, R, U Menchini, and R Dei. "Antimicrobial Activity of Antibiotic-Treated Amniotic Membrane: An in Vitro Study." *Cornea* 25, no. 4 (2006).

Meng, H, M Li, F You, J Du, and Z Luo. "Assessment of Processed Human Amniotic Membrane as a Protective Barrier in Rat Model of Sciatic Nerve Injury." *Neuroscience Letters* 496, no. 1 (2011): 48-53.

Miki, T, T Lehmann, H Cai, DB Stolz, and SC Strom. "Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells." *Stem Cells* 23, no. 10 (2005): 1549-1559.

Moon, RT, AiD Kohn, GV Ferrari, and A Kaykas. "WNT and  $\beta$ -Catenin Signalling: Diseases and Therapies." *Nature Reviews: Genetics* 5, no. 9 (2004): 691-701.

Moore, KL, and TVN Persaud. *Embriologia Básica*. 7th ed. Elsevier, 2008.

Mosmann, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65, no. 1-2 (1983): 55-63.

Mukhopadhyay, Asok, Carlos Bueso-Ramos, Devasis Chatterjee, Panayotis Pantazis, and Bharat B Aggarwal. "Curcumin Downregulates Cell Survival Mechanisms in Human Prostate Cancer Cell Lines." *Oncogene* 20, no. 52 (2001): 7597-7609.

Nakabayashi, H, K Taketa, K Miyano, T Yamane, and J Sato. "Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium." *Cancer Research* 42 (1982): 3858-3863.

Nejak-bowen, KN, and SPS Monga. "Beta-Catenin Signaling, Liver Regeneration and Hepatocellular Cancer: Sorting the Good from the Bad." *Seminars in Cancer Biology* 21, no. 1 (2011): 44-58.

Niknejad, H, and G Yazdanpanah. "Anticancer Effects of Human Amniotic Membrane and Its Epithelial Cells." *Medical Hypotheses* 82, no. 4 (2014): 488-489.

Niknejad, H, G Yazdanpanah, M Mirmasoumi, H Abolghasemi, H Peirovi, and A Ahmadiani. "Inhibition of HSP90 Could Be Possible Mechanism for Anti-Cancer Property of Amniotic Membrane." *Medical Hypotheses* 81, no. 5 (2013): 862-865.

Niknejad, H, H Peirovi, M Jorjani, A Ahmadiani, J Ghanavi, and AM Seifalian. "Properties of the Amniotic Membrane for Potential Use in Tissue Engineering." *European Cells & Materials* 15 (2008): 88-99.

Niknejad, H, M Khayat-Khoei, H Peirovi, and H Abolghasemi. "Human Amniotic Epithelial Cells Induce Apoptosis of Cancer Cells: A New Anti-Tumor Therapeutic Strategy." *Cytotherapy* 16, no. 1 (2014): 33-40.

Nishida, N, H Yano, T Nishida, T Kamura, and M Kojiro. "Angiogenesis in Cancer." *Vascular Health and Risk Management* 2, no. 3 (2006): 213-219.

Nisolle, M, and J Donnez. "Vaginoplasty Using Amniotic Membranes in Cases of Vaginal Agenesis or after Vaginectomy." *Journal of Gynecologic Surgery* 8, no. 1 (1992): 25-30.

Nogami, M, H Tsuno, C Koike, M Okabe, T Yoshida, S Seki, Y Matsui, T Kimura, and T Nikaido. "Isolation and Characterization of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells and Their Chondrogenic Differentiation." *Transplantation* 93, no. 12 (2012): 1221-1228.

Oberg, K. "Chemotherapy and Biotherapy in the Treatment of Neuroendocrine Tumours." *Annals of Oncology* 12, no. 2 (2001): S111-S114.

Oberhammer, F, JW Wilson, C Dive, ID Morris, JA Hickman, AE Wakeling, PR Walker, and M Sikorska. "Apoptotic Death in Epithelial Cells: Cleavage of DNA to 300 And/or 50 Kb Fragments prior to or in the Absence of Internucleosomal Fragmentation." *The EMBO Journal* 12, no. 9 (1993): 3679-3684.

Olive, PL, and JP Banáth. "The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells." *Nature Protocols* 1, no. 1 (2006): 23-29.

Oliveira, G, and A Pereira. "Ethical and Legal Concerns of the Use of Amniotic Membrane." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1th ed., 231-244. *Springer Netherlands*, 2015.

Olson, DM, and ZS Hons. "Arachidonic Acid Incorporation into Lipids of Term Human Amnion." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 159, no. 4 (1985): 995-1001.

Ozgenel, GY, and G Fílíz. "Combined Application of Human Amniotic Membrane Wrapping and Hyaluronic Acid Injection in Epineurectomized Rat Sciatic Nerve." *Journal of Reconstructive Microsurgery* 20, no. 2 (2004): 153-157.

Palaćin, M, MA Lasunción, RM del Rio, and E Herrera. "Placental Formation of Lactate from Transferred L-Alanine and Its Impairment by Aminooxyacetate in the Late-Pregnant Rat." *Biochimica et Biophysica Acta* 841, no. 1 (1985): 90-96.

Parker, WB, and YC Cheng. "Metabolism and Mechanism of Action of 5-Fluorouracil." *Pharmacology & Therapeutics* 48, no. 3 (1990): 381-395.

Parolini, O, F Alviano, GP Bagnara, G Bilic, H-J Bühring, M Evangelista, S Hennerbichler, B Liu, M Magatti, N Mao, T Miki, F marongiu, H Nakajima, T Nikaido, CB Portmann-Lanz, V Sankar, M Soncini, G Stadler, D Surbek, TA Takahashi, H Redl, N Sakuragawa, S Wolbank, S Zeisberger, A Zisch, SC Strom. "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, no. 2 (2008): 300-311.

Parolini, O, L Souza-moreira, FO Valle, M Magatti, P Hernandez-cortes, E Gonzalez-rey, and M Delgado. "Therapeutic Effect of Human Amniotic Membrane - Derived Cells on Experimental Arthritis and Other Inflammatory Disorders." *Arthritis & Rheumatology* 66, no. 2 (2014): 327-339.

Pelicano, H, DS Martin, R-H Xu, and P Huang. "Glycolysis Inhibition for Anticancer Treatment." *Oncogene* 25, no. 34 (2006): 4633-4646.

Pellicoro, A, P Ramachandran, JP Iredale, and JA Fallowfield. "Liver Fibrosis and Repair: Immune Regulation of Wound Healing in a Solid Organ." *Nature Reviews: Immunology* 14, no. 3 (2014): 181-194.

Perry, SW, JP Norman, J Barbieri, EB Brown, and A Harris. "Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide." *Biotechniques* 50, no. 2 (2011): 98-115.

Pietras, K, and A Östman. "Hallmarks of Cancer: Interactions with the Tumor Stroma." *Experimental Cell Research* 316, no. 8 (2010): 1324-1331.

Pinto, VD, A Messina, DJR Lane, and A Lawen. "Voltage-Dependent Anion-Selective Channel (VDAC ) in the Plasma Membrane." *FEBS Letters* 584, no. 9 (2010): 1793-1799.

Pinzani, M, and K Rombouts. "Liver Fibrosis: From the Bench to Clinical Targets." *Digestive and Liver Disease* 36, no. 4 (2004): 231-242.

Pollard, SM, NN Aye, and EM Symonds. "Scanning Electron Microscope Appearances of Normal Human Amnion and Umbilical Cord at Term." *International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 83, no. 6 (1976): 470-477.

Pritchard, ET, WD Armstrong, and JC Wilt. "Examination of Lipids from Amnion, Chorion and Vernix." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 100, no. 2 (1968): 289-298.

Prouillac, C, and S Lecoeur. "The Role of the Placenta in Fetal Exposure to Xenobiotics: Importance of Membrane Transporters and Human Models for Transfer Studies." *Drug Metabolism and Disposition* 38, no. 10 (2010): 1623-1635.

Punchihewa, C, A Inoue, A Hishiki, Y Fujikawa, M Connelly, B Evison, Y Shao, I Kuraoka, P Rodrigues, H Hashimoto, M Kawanishi, M Sato, T Yagi, N Fujii. "Identification of Small Molecule Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Inhibitor That Disrupts Interactions with PIP-Box Proteins and Inhibits DNA Replication." *Journal of Biological Chemistry* 287, no. 17 (2012): 14289-14300.

Qi, H, L Li, W Zong, BJ Hyer, and J Huang. "Expression of Aquaporin 8 Is Diversely Regulated by Osmotic Stress in Amnion Epithelial Cells." *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 35, no. 6 (2009): 1019-1025.

Qin, L, and Y-P Han. "Epigenetic Repression of Matrix Metalloproteinases in Myofibroblastic Hepatic Stellate Cells through Histone Deacetylases 4: Implication in Tissue Fibrosis." *The American Journal of Pathology* 177, no. 4 (2010): 1915-1928.

Rakha, EA, ME El-Sayed, AR Green, AHS Lee, JF Robertson, and IO Ellis. "Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer." *Cancer* 109, no. 1 (2007): 25-32.

Rakoff-Nahoum, S. "Why Cancer and Inflammation?" *Yale Journal of Biology and Medicine* 79 (2006): 123-130.

Reiser, M, I Neumann, W Schmiegel, P-C Wu, and JYN Lau. "Induction of Cell Proliferation Arrest and Apoptosis in Hepatoma Cells through Adenoviral-Mediated Transfer of p53 Gene." *Journal of Hepatology* 32, no. 5 (2000): 771-782.

Reuter, S, SC Gupta, MM Chaturvedi, and BB Aggarwal. "Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked?" *Free Radical Biology and Medicine* 49, no. 11 (2010): 1603-1616.

Ricci, E, LB Sant'Anna, A Cagnoni, L Ressel, G Vanosi, and O Parolini. "Application of Human Amniotic Membrane on Rat Liver Following Left Hepatectomy: Evaluation of Liver Reaction." *Placenta* 32 (2011): S326-S340.

Riss, TL, RC Moravec, AL Niles, HA Benink, TJ Worzella, and L Minor. "Cell Viability Assays." In *Assay Guidance Manual*, edited by GS Sittampalam, NP Coussens, and H Nelson, 1-23. Bethesda (MD): *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, 2013.

Rocha, SCM, and CJM Baptista. "Biochemical Properties of Amniotic Membrane." In *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*, edited by AC Mamede and MF Botelho, 1st ed., 19-40. *Springer Netherlands*, 2015.

Rolfo, A, D Giuffrida, MC Giuffrida, T Todros, and AE Calogero. "New Perspectives for Prostate Cancer Treatment: In Vitro Inhibition of LNCaP and PC3 Cell Proliferation by Amnion-Derived Mesenchymal Stromal Cells Conditioned Media." *The Aging Male* 17, no. 2 (2014): 94-101.

Rötth, AA. "Plastic Repair of Conjunctival Defects with Fetal Membranes." *Archives of Ophthalmology* 23, no. 3 (1940): 522-525.

Ruggeri, BA, F Camp, and S Miknyoczki. "Animal Models of Disease: Pre-Clinical Animal Models of Cancer and Their Applications and Utility in Drug Discovery." *Biochemical Pharmacology* 87, no. 1 (2014): 150-161.

Sabella, N. "Use of the Fetal Membranes in Skin Grafting." *Medication Reconciliation* 83 (1913): 478-480.

Sadler, TW. *Langman's Medical Embryology*. 8th ed. London: *LWW*, 2000.

Salvioli, S, A Ardizzoni, C Franceschi, and A Cossarizza. "JC-1, but Not DiOC6(3) or Rhodamine 123, Is a Reliable Fluorescent Probe to Assess  $\Delta\Psi$  Changes in Intact Cells:

Implications for Studies on Mitochondrial Functionality during Apoptosis.” *FEBS Letters* 411, no. 1 (1997): 77-82.

Sánchez-Alcázar, JA, JG Ault, A Khodjakov, and E Schneider. “Increased Mitochondrial Cytochrome c Levels and Mitochondrial Hyperpolarization Precede Camptothecin-Induced Apoptosis in Jurkat Cells.” *Cell Death and Differentiation* 7, no. 11 (2000): 1090-1100.

Sant’Anna, LB, A Cargnoni, L Ressel, G Vanosi, and O Parolini. “Amniotic Membrane Application Reduces Liver Fibrosis in a Bile Duct Ligation Rat Model.” *Cell Transplantation* 20, no. 3 (2011): 441-453.

Santos, K, M Laranjo, AM Abrantes, AF Brito, C Gonçalves, AB Sarmiento Ribeiro, MF Botelho, Maria I.L. L Soares, Andreia S.R. R Oliveira, and Teresa M.V.D. Pinho e Melo. “Targeting Triple-Negative Breast Cancer Cells with 6,7-Bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-C]thiazoles.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 79 (2014): 273-281.

Sawhney, CP. “Amniotic Membrane as a Biological Dressing in the Management of Burns.” *Burns* 15, no. 5 (1989): 339-342.

Schaefer, A, F Piquard, P Dellenbach, and P Haberey. “Placenta-Fetal ‘alanina-Lactate Cycle’ in the Human during Late Gestation.” *Trophoblast Research* 7 (1993): 103-114.

Schulze-Osthoff, K, H Walczak, W Dröge, and PH Krammer. “Cell Nucleus and DNA Fragmentation Are Not Required for Apoptosis.” *Journal of Cell Biology* 127, no. 1 (1994): 15-20.

Schuppan, D, and NH Afdhal. “Liver Cirrhosis.” *The Lancet* 371 (2008): 838-851.

Schütte, K, J Bornschein, and P Malfertheiner. “Hepatocellular Carcinoma-Epidemiological Trends and Risk Factors.” *Digestive Diseases* 27 (2009): 80-92.

Seeley, R, T Stephens, and P Tate. *Anatomy and Physiology*. 6th ed. McGraw-Hill Companies Inc., 2003.

Seo, JH, YH Kim, and JS Kim. “Properties of the Amniotic Membrane May Be Applicable in Cancer Therapy.” *Medical Hypotheses* 70, no. 4 (2008): 812-814.

Shao, C, J Sima, SX Zhang, J Jin, P Reinach, Z Wang, and J-X Ma. “Suppression of Corneal Neovascularization by PEDF Release from Human Amniotic Membranes.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45, no. 6 (2004): 1758-1762.

Shapiro, GI, and JW Harper. “Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control.” *The Journal of Clinical Investigation* 104, no. 12 (1999): 1645-1653.

Shen, DW, YG Lu, KV Chin, I Pastan, and MM Gottesman. “Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Exhibit Multidrug Resistance Unrelated to MRD1 Gene Expression.” *Journal of Cell Science* 98, no. 3 (1991): 317-322.

Shimmura, S, J Shimazaki, Y Ohashi, and K Tsubota. “Antiinflammatory Effects of Amniotic Membrane Transplantation in Ocular Surface Disorders.” *Cornea* 20, no. 4 (May 2001): 408-413.

Shoshan-Barmatz, V, D Ben-Hail, L Admoni, Y Krelin, and SS Tripathi. “The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1 in Tumor Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1848, no. 10 (2015): 2547-2575.

- Siddik, ZH. "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance." *Oncogene* 22, no. 47 (2003): 7265-7279.
- Siegel, RL, KD Miller, and A Jemal. "Cancer Statistics, 2016." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66, no. 1 (2016): 7-30.
- Simão, AA. "Carcinoma Hepatocelular: Estudo Clínico, Caracterização Bioquímica E Marcadores de Rastreo E Diagnóstico." *Universidade de Coimbra*, 2014.
- Smiley, ST, M Reers, C Mottola-Hartshorn, M Lin, A Chen, TW Smith, GD Steele, and LB Chen. "Intracellular Heterogeneity in Mitochondrial Membrane Potentials Revealed by a J-Aggregate-Forming Lipophilic Cation JC-1." *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, no. 9 (1991): 3671-3675.
- Soncini, M, E Vertua, L Gibelli, F Zorzi, M Denegri, A Albertini, GS Wengler, and O Parolini. "Isolation and Characterization of Mesenchymal Cells from Human Fetal Membranes." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1, no. 4 (2007): 296-305.
- Sorsby, A, and HM Symons. "Amniotic Membrane Grafts in Caustic Burns of the Eye." *British Journal of Ophthalmology* 30, no. 6 (1946): 337-345.
- Stark, GR, and WR Taylor. "Analyzing the G2/ M Checkpoint." In *Checkpoint Controls and Cancer: Reviews and Model Systems*, edited by Axel H Schonthal, 280:51-82. Totowa: *Humana Press*, 2004.
- Steed, DL, C Trumpower, D Duffy, C Smith, V Marshall, R Rupp, and M Robson. "Amnion-Derived Cellular Cytokine Solution: A Physiological Combination of Cytokines for Wound Healing." *Eplasty* 8 (2008): 157-165.
- Steele, VE, RA Lubet, and RC Moon. "Preclinical Animal Models for the Development of Cancer Chemoprevention Drugs." In *Cancer Chemoprevention*, edited by GJ Kelloff, ET Hawk, and CC Sigman, 2:39-46. *Humana Press*, 2005.
- Stern, M. "The Grafting of Preserved Amniotic Membrane to Burned and Ulcerated Surfaces, Substituting Skin Grafts: A Preliminary Report." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 60, no. 13 (1913): 973-974.
- Stribley, JM. "Anatomy," 2015 ([www.studyblue.com](http://www.studyblue.com)).
- Szakács, G, JK Paterson, JA Ludwig, C Booth-Genthe, and MM Gottesman. "Targeting Multidrug Resistance in Cancer." *Nature Reviews* 5 (2006): 219-234.
- Takaki, A, and Kazuhide Yamamoto. "Control of Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma: Helpful or Harmful?" *World Journal of Hepatology* 7, no. 7 (2015): 968-979.
- Takashima, S, H Ise, P Zhao, T Akaike, and T Nikaido. "Human Amniotic Epithelial Cells Possess Hepatocyte-like Characteristics and Functions." *Cell Structure and Function* 29, no. 3 (2004): 73-84.
- Takashima, S, M Yasuo, N Sanzen, K Sekiguchi, M Okabe, T Yoshida, A Toda, and T Nikaido. "Characterization of Laminin Isoforms in Human Amnion." *Tissue and Cell* 40, no. 2 (2008): 75-81.

Talmi, YP, L Sigler, E Inge, Y Finkelstein, and Y Zohar. "Antibacterial Properties of Human Amniotic Membranes." *Placenta* 12, no. 3 (1991): 285-288.

Tamagawa, T, S Oi, I Ishiwata, H Ishikawa, and Y Nakamura. "Differentiation of Mesenchymal Cells Derived from Human Amniotic Membranes into Hepatocyte-like Cells in Vitro." *Human Cell* 20, no. 3 (2007): 77-84.

Tamagawa, Tomoharu, Isamu Ishiwata, and Shigeo Saito. "Establishment and Characterization of a Pluripotent Stem Cell Line Derived from Human Amniotic Membranes and Initiation of Germ Layers in Vitro." *Human Cell* 17, no. 3 (2004): 125-130.

Tancer, ML, M Katz, and NP Veridiano. "Vaginal Epithelialization with Human Amnion." *Obstetrics & Gynecology* 54, no. 3 (1979): 345-349.

Teufel, A, A Weinmann, C Centner, A Piendl, AW Lohse, PR Galle, and S Kanzler. "Hepatocellular Carcinoma in Patients with Autoimmune Hepatitis." *World Journal of Gastroenterology* 15, no. 5 (2009): 578-582.

Thakur, R, and DP Mishra. "Pharmacological Modulation of Beta-Catenin and Its Applications in Cancer Therapy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17, no. 4 (2013): 449-456.

Thorgeirsson, SS, and JW Grisham. "Molecular Pathogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma." *Nature Genetics* 31, no. August (2002): 339-346.

Thorn, CF, C Oshiro, S Marsh, T Hernandez-Boussard, H McLeod, TE Klein, and RB Altman. "Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects." *Pharmacogenet Genomics* 21, no. 7 (2012): 440-446.

Tice, RR, E Agurell, D Anderson, B Burlinson, A Hartmann, H Kobayashi, Y Miyamae, E Rojas, J-C Ryu, and YF Sasaki. "Single Cell Gel/comet Assay: Guidelines for in Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Testing." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, no. 3 (2000): 206-221.

Toda, A, M Okabe, T Yoshida, and T Nikaido. "The Potential of Amniotic Membrane/amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues." *Journal of Pharmacological Sciences* 105, no. 3 (2007): 215-228.

Tralhão, JG, AM Abrantes, E Hoti, B Oliveiros, D Cardoso, F Faitot, C Carvalho, MF Botelho, and F Castro-Sousa. "Hepatectomy and Liver Regeneration: From Experimental Research to Clinical Application." *ANZ Journal of Surgery* 84 (2013): 665-671.

Tritto, G, RRP Mookerjee, and R Jalan. "2',7'-Dichlorofluorescein Is Not a Probe for the Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species." *Journal of Hepatology* 56 (2012): 1214-1216.

Tsang, W-P, SPY Chau, K-P Fung, S-K Kong, and T-T Kwok. "Modulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1) by p53 Mutant in Saos-2 Cells." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 51, no. 2 (2003): 161-166.

Tsukada, S, CJ Parsons, and RA Rippe. "Mechanisms of Liver Fibrosis." *Clinica Chimica Acta* 364, no. 1-2 (2006): 33-60.

Ueta, M, MN Kweon, Y Sano, C Sotozono, J Yamada, N Koizumi, H Kiyono, and S Kinoshita. "Immunosuppressive Properties of Human Amniotic Membrane for Mixed Lymphocyte Reaction." *Clinical and Experimental Immunology* 129, no. 3 (September 2002): 464-470.

Urtasun, R, C Berasain, and MA Avila. "Oxidative Stress Mechanisms in Hepatocarcinogenesis." In *Studies on Hepatic Disorders*, edited by E Albano and M Parola, 449-477. Switzerland: *Springer International*, 2015.

Valko, M, D Leibfritz, J Moncol, MT D Cronin, M Mazur, and J Telser. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, no. 1 (2007): 44-84.

Van Cruchten, S, and W Van den Broeck. "Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis." *Anatomy, Histology and Embryology* 31, no. 4 (2002): 214-223.

Vega-Avila, E, and MK Pugsley. "An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells." *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54 (2011): 10-14.

Vichai, V, and K Kirtikara. "Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening." *Nature Protocols* 1, no. 3 (2006): 1112-1116.

Villinger, S, R Briones, K Giller, U Zachariae, A Lange, BLD Groot, C Griesinger, S Becker, and M Zweckstetter. "Functional Dynamics in the Voltage- Dependent Anion Channel." *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, no. 52 (2010): 22546-22551.

Vitale, M, L Zamai, G Mazzotti, A Cataldi, and E Falcieri. "Differential Kinetics of Propidium Iodide Uptake in Apoptotic and Necrotic Thymocytes." *Histochemistry* 100, no. 3 (1993): 223-229.

Von Ahsen, O, NJ Waterhouse, T Kuwana, DD Newmeyer, and DR Green. "The 'Harmless' Release of Cytochrome C." *Cell Death and Differentiation* 7, no. 12 (2000): 1192-1199.

Voronkov, A, and S Krauss. "Wnt/beta-Catenin Signaling and Small Molecule Inhibitors." *Current Pharmaceutical Design* 19, no. 4 (2013): 634-664.

Wang, S, F Amidi, M Beall, L Gui, and MG Ross. "Aquaporin 3 Expression in Human Fetal Membranes and Its up-Regulation by Cyclic Adenosine Monophosphate in Amnion Epithelial Cell Culture." *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 13, no. 3 (2006): 181-185.

Wang, Z, and Y Sun. "Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy." *Translational Oncology* 3, no. 1 (2010): 1-12.

Wang, Z, Y-Y Sheng, X-M Gao, C-Q Wang, X-Y Wang, X Lu, J-W Wei, K-L Zhang, Q-Z Dong, and L-X Qin. "B-Catenin Mutation Is Correlated with a Davorable Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma." *Molecular and Clinical Oncology* 3 (2015): 936-940.

Wei, JP, M Nawata, S Wakitani, K Kametani, M Ota, A Toda, I Konishi, S Ebara, and T Nikaido. "Human Amniotic Mesenchymal Cells Differentiate into Chondrocytes." *Cloning and Stem Cells* 11, no. 1 (2009): 19-26.

Werner, B, and MJ Piazza. "Ultrastructural Study of the Neovagina Following the Utilization of Human Amniotic Membrane for Treatment of Congenital Absence of the Vagina." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30 (1997): 861-864.

Wolbank, S, F Hildner, H Redl, M van Griensven, C Gabriel, and S Hennerbichler. "Impact of Human Amniotic Membrane Preparation on Release of Angiogenic Factors." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 3, no. 8 (2009): 651-654.

Wolf, HJ, and G Desoye. "Immunohistochemical Localization of Glucose Transporters and Insulin Receptors in Human Fetal Membranes at Term." *Histochemistry* 100, no. 5 (1993): 379-385.

Wolf, HJ, W Schmidt, and D Drenckhahn. "Immunocytochemical Analysis of the Cytoskeleton of the Human Amniotic Epithelium." *Cell and Tissue Research* 266, no. 2 (1991): 385-389.

Wörns, MA, and PR Galle. "Future Perspectives in Hepatocellular Carcinoma." *Digestive and Liver Disease* 42, no. 3 (2010): 302-309.

Wrzesinski, SJ, TH Taddei, and M Strazzabosco. "Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma." *Clinical Liver Disease* 15, no. 2 (2013): 423-441.

Wu, G, L Xu, N Lin, and B Liu. "UCN-01 Induces S and G2/M Cell Cycle Arrest through the p53/p21waf1 or CHK2/CDC25C Pathways and Can Suppress Invasion in Human Hepatoma Cell Lines." *BMC Cancer* 13, no. 1 (2013): 167.

Xing, AY, JC Challier, J Lepercq, M Cauzac, MJ Charron, J Girard, and S Hauguel-de Mouzon. "Unexpected Expression of Glucose Transporter 4 in Villous Stromal Cells of Human Placenta." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83, no. 11 (1998): 4097-4101.

Xu, R-H, H Pelicano, Y Zhou, JS Carew, L Feng, KN Bhalla, MJ Keating, and P Huang. "Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia." *Cancer Research* 65, no. 2 (2005): 613-621.

Yang, H-I, S-N Lu, Y-F Liaw, A-L You, C-A Sun, L-Y Wang, CK Hsiao, P-J Chen, D-S Chen, and C-J Chen. "Hepatitis B Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 347, no. 3 (2002): 168-174.

Yang, JD, and LR Roberts. "Hepatocellular Carcinoma: A Global View." *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology* 7, no. 8 (2010): 448-458.

Yao, Wantong, Xianjun Yu, Zhengyu Fang, Peng Yin, Chao Zhao, Na Li, Liying Wang, Zengxia Li, and Xiliang Zha. "Profilin1 Facilitates Staurosporine-Triggered Apoptosis by Stabilizing the Integrin B1-Actin Complex in Breast Cancer Cells." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16, no. 4 (2012): 824-835.

Yoneda, M, M Yamagata, S Suzuki, and K Kimata. "Hyaluronic Acid Modulates Proliferation of Mouse Dermal Fibroblasts in Culture." *Journal of Cell Science* 90 ( Pt 2), no. 1975 (1988): 265-273.

Yu, M-W, S-H Yeh, P-J Chen, Y-F Liaw, C-L Lin, C-J Liu, W-L Shih, J-H Kao, D-S Chen, and C-J Chen. "Hepatitis B Virus Genotype and DNA Level and Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study in Men." *JNCI: The Journal of the National Cancer Institute* 97, no. 4 (2005): 265-272.

Yuste, VJ, JR Bayascas, N Llecha, I Sanchez-Lopez, J Boix, and JX Comella. "The Absence of Oligonucleosomal DNA Fragmentation during Apoptosis of IMR-5 Neuroblastoma Cells." *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 25 (2001): 22323-22331.

Zafar, M, S Saeed, B Kant, B Murtaza, MF Dar, and NA Khan. "Use of Amnion in Vaginoplasty for Vaginal Atresia." *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 17, no. 2 (2007): 107-109.

Zamai, L, E Falcieri, G Marhefka, and M Vitale. "Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptotic Cells in the Absence of Nucleosomal DNA Fragmentation." *Cytometry* 23 (1996): 303-311.

Zetter, BR. "The Scientific Contributions of M. Judah Folkman to Cancer Research." *Nature Reviews: Cancer* 8, no. 8 (2008): 647-654.

Zhang, DG, MY Jiang, and D Miao. "Transplanted Human Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Carbon Tetrachloride-Induced Liver Cirrhosis in Mouse." *PLOS ONE* 6, no. 2 (2011): 1-9.

Zhao, P, X Yang, S Qi, H Liu, H Jiang, S Hoppmann, Q Cao, M S Chua, S K So, and Z Cheng. "Molecular Imaging of Hepatocellular Carcinoma Xenografts with Epidermal Growth Factor Receptor Targeted Affibody Probes." *BioMed Research International* 759057 (2013): 1-11.

Zhou, W-C, Q-B Zhang, and L Qiao. "Pathogenesis of Liver Cirrhosis." *World Journal of Gastroenterology* 20, no. 23 (2014): 7312-7324.

Zhu, G-N, L Zuo, Q Zhou, S-M Zhang, H-Q Zhu, S-Y Gui, and Y Wang. "Loss of Heterozygosity on Chromosome 10q22-10q23 and 22q11.2-22q12.1 and p53 Gene in Primary Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology* 10, no. 13 (2004): 1975-1978.

Züchner, T. Working with Proteins: Protein Stability and Storage - a Brief Guide, 2015.

Zusterzeel, PLM, H Rütten, HMJ Roelofs, WHM Peters, and EAP Steegers. "Protein Carbonyls in Decidua and Placenta of Pre-Eclamptic Women as Markers for Oxidative Stress." *Placenta* 22, no. 2-3 (2001): 213-219.

<http://www.scanburresearch.com>

<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>



## **Lista de publicações relacionadas com a tese**



## Artigos em revistas com arbitragem científica

S, Guerra; **AC, Mamede**; MJ, Carvalho; M, Laranjo; JG, Tralhão; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2016. "Liver diseases: what is known so far about the therapy with human amniotic membrane?", *Cell and Tissue Banking* (aceite para publicação após revisão).

**AC, Mamede**; S, Guerra; M, Laranjo; K, Santos; MJ, Carvalho; T, Carvalheiro; P, Moura; A, Paiva; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2016. "Oxidative stress, DNA, cell cycle/cell cycle associated proteins and multidrug resistance proteins: targets of human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma", *Pathology & Oncology Research*, DOI: 10.1007/s12253-016-0053x (artigo em impressão).

AF, Brito; M, Ribeiro; AM, Abrantes; **AC, Mamede**; M, Laranjo; JE, Casalta-Lopes; AC, Gonçalves; AB, Sarmiento-Ribeiro; JG, Tralhão; MF, Botelho. 2016. "New approach for treatment of primary liver tumors: the role of quercetin", *Nutrition and Cancer*, 68(2):250-66.

**AC, Mamede**; S, Guerra; M, Laranjo; MJ, Carvalho; RC, Oliveira; AC, Gonçalves; R, Alves; L, Prado e. C; AB, Sarmiento-Ribeiro; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2015. "Selective cytotoxicity and cell death induced by human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma", *Medical Oncology* 32, 12: 257.

**AC, Mamede**; M, Laranjo; MJ, Carvalho; AM, Abrantes; AS, Pires; AF, Brito; P, Moura; CJ, Maia; MF, Botelho. 2014. "Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study", *The Journal of Membrane Biology* 247, 4: 357 - 360.

AF, Brito; AM, Abrantes; C, Pinto-Costa; AR, Gomes; **AC, Mamede**; JE, Casalta-Lopes; AC, Gonçalves; AB, Sarmiento-Ribeiro; JG, Tralhão; MF, Botelho. 2012. "Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53", *Chemotherapy* 58, 5: 381 - 386.

**AC, Mamede**; MJ, Carvalho; AM, Abrantes; M, Laranjo; CJ, Maia; MF, Botelho. 2012. "Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications", *Cell and tissue research* 349, 2: 447 - 458.

## Livros publicados

AC, Mamede; MF, Botelho. eds. 2015. Amniotic membrane: origin, characterization and medical applications ed. 1. Holanda: *Springer*.

## Capítulos de livros publicados

AC, Mamede; AS, Pires; AF, Brito. 2015. Amniotic membrane in cancer. In Amniotic membrane: origin, characterization and medical applications, ed. Ana Catarina Mamede & Maria Filomena Botelho, 139 - 152. Holanda: *Springer*.

## Resumos em revistas com arbitragem científica

AP, Alves; AC, Mamede; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; MF, Botelho; CJ, Maia. 2015. "Hepatocellular carcinoma therapy based on human amniotic membrane: inhibition of GLUT and PgP expression", Trabalho apresentado em Actualizações em Oncologia 2015 - 4.º Congresso do CIMAGO, In *Revista Portuguesa de Pneumologia*, Coimbra.

AC, Mamede; AP, Alves; M, Laranjo; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2015. "Cancer cell death profile induced by human amniotic membrane extracts treatment", Trabalho apresentado em Actualizações em Oncologia 2015 - 4.º Congresso do CIMAGO, In *Revista Portuguesa de Pneumologia*, Coimbra.

AC, Mamede; S, Guerra; M, Laranjo; AF, Brito; K, Santos; MJ, Carvalho; JG, Tralhão; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2014. "Human amniotic membrane-derived proteins display anticancer activity in hepatocellular carcinoma", Trabalho apresentado em EASL HCC Summit: Molecular Pathogenesis and Translational Research in Liver Cancer, In *Journal of Hepatology*, Genebra.

**AC, Mamede;** S, Guerra; M, Laranjo; MJ, Carvalho; AS, Pires; AF, Brito; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2014. "Extraction, identification and metabolic effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines", Trabalho apresentado em Actualizações em Oncologia 2014 - 3.º Congresso do CIMAGO, In *Revista Portuguesa de Pneumologia*, Coimbra.

S, Guerra; **AC, Mamede;** M, Laranjo; MJ, Carvalho; AF, Brito; AS, Pires; K, Santos; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2014. "Amniotic membrane: a new approach for liver malignancy", Trabalho apresentado em Actualizações em Oncologia 2014 - 3.º Congresso do CIMAGO, In *Revista Portuguesa de Pneumologia*, Coimbra.

**AC, Mamede;** S, Guerra; M, Laranjo; AF, Brito; AS, Pires; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2014. "Anti-cancer proteins found in amniotic membrane: extraction, identification and cellular effects", Trabalho apresentado em 23rd Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR-23), In *European Journal of Cancer*, Munique.

S, Guerra; **AC, Mamede;** M, Laranjo; AS, Pires; MJ, Carvalho; AF, Brito; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2014. "Human amniotic membrane secreted factors plus chemotherapy: a mishmash of effects?", Trabalho apresentado em 23rd Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR-23), In *European Journal of Cancer*, Munique.

**AC, Mamede;** M, Laranjo; S, Moreira; MJ, Carvalho; AM, Abrantes; AS, Pires; JE, Casalta-Lopes; CJ, Maia; MF, Botelho. 2013. "Effects of amniotic membrane proteins on mitochondrial activity, protein synthesis, cell viability and DNA of prostate cancer cell lines: preliminary results", Trabalho apresentado em European Cancer Congress (ECCO17 - ESMO38 - ESTRO32), In *European Journal of Cancer*, Amsterdão.

## **Apresentação oral de trabalhos**

AP, Alves; **AC, Mamede;** MG, Alves; PF, Oliveira; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; MF, Botelho; CJ, Maia. Hepatocellular carcinoma therapy based on human amniotic membrane: glycolytic and resistance profile study, XI Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, 2016 (Comunicação).

AP, Alves; **AC, Mamede**; MG, Alves; PF, Oliveira; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; MF, Botelho; CJ, Maia. “*Hepatocellular carcinoma therapy based on human amniotic membrane glycolytic and resistance profile study*”, I Congress in Health Sciences Research: Towards Innovation and Entrepreneurship Trends in Endocrinology and Neurosciences, Covilhã, 2015 (Comunicação).

**AC, Mamede**; S, Guerra; AP, Alves; MJ, Carvalho; M, Laranjo; AF, Brito; AS, Pires; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; JG, Tralhão; MF, Botelho; F, Castro-Sousa. “*Extratos de membrana amniótica no tratamento do carcinoma hepatocelular: estudos in vitro e in vivo*”, XXXV Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, 2015 (Comunicação).

**AC, Mamede**; AI, Fernandes; S, Guerra; AP, Alves; MJ, Carvalho; M, Laranjo; P, Moura; AM, Abrantes; JG, Tralhão; CJ, Maia; MF, Botelho. “*O carcinoma hepatocelular como alvo da terapia com a membrana amniótica humana: estudos in vitro e in vivo*”, Congresso Português de Hepatologia 2015, Lisboa, 2015 (Poster).

S, Guerra; **AC, Mamede**; K, Santos; AF, Brito; M, Laranjo; MJ, Carvalho; AS, Pires; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. “*Proteínas da membrana amniótica com efeito anti-cancerígeno: a síntese proteica e o ADN como alvo no carcinoma hepatocelular*”, Semana Digestiva 2014, Estoril, 2014 (Poster).

**AC, Mamede**; S, Guerra; AP, Alves; MJ, Carvalho; AC, Gonçalves; AB, Sarmiento-Ribeiro; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. “*Cell death and oxidative stress profile in human hepatocellular carcinoma cell lines after treatment with amniotic membrane*”, 1st ASPIC International Congress, Lisboa, 2014 (Poster).

S, Guerra; **AC, Mamede**; M, Laranjo; AS, Pires; MJ, Carvalho; AF, Brito; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. “*Membrana amniótica & quimioterapia: nova abordagem terapêutica?*”, Pharmacy Master Symposium, Coimbra, 2014 (Comunicação).

S, Guerra; **AC, Mamede**; AP, Alves; MJ, Carvalho; T, Carvalheiro; P, Moura; A, Paiva; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. “*Human amniotic membrane-derived proteins: what are the action mechanisms against hepatocellular carcinoma?*”, 1st ASPIC International Congress, Lisboa, 2014 (Poster).

AC, Mamede; S, Guerra; AP, Alves; MJ, Carvalho; AC, Gonçalves; AB, Sarmiento-Ribeiro; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. *“Treatment with amniotic membrane induces cell death and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma cell lines”*, VI Annual Meeting of IBILI, Coimbra, 2014 (Poster)

AC, Mamede; S, Guerra; M, Laranjo; K, Santos; T, Carvalheiro; MJ, Carvalho; P, Moura; A, Paiva; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. *“Hepatocellular carcinoma treatment with human amniotic membrane extract: assembling a cellular puzzle”*, 3rd IPLASS Meeting, Granada, 2014 (Comunicação).

S, Guerra; AC, Mamede; AF, Brito; M, Laranjo; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. *“Human amniotic membrane secreted factors: association with conventional chemotherapy for hepatocellular carcinoma therapy”*, 3rd IPLASS Meeting, Granada, 2014 (Poster).

S, Guerra; AC, Mamede; K, Santos; MJ, Carvalho; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. *“Human amniotic membrane-derived proteins: a new approach for hepatocellular carcinoma treatment?”*, IX Young European Scientists Meeting, Porto, 2014 (Poster).

AC, Mamede; S, Guerra; M, Laranjo; AF, Brito; MJ, Carvalho; K, Santos; AM, Abrantes; P, Moura; CJ, Maia; JG, Tralhão; MF, Botelho; F, Castro-Sousa. *“Bioterapia no carcinoma hepatocelular: a membrana amniótica como opção?”*, XXXIV Congresso Nacional de Cirurgia, Praia da Falésia, 2014 (Comunicação).

AC, Mamede; S, Guerra; AF, Brito; M, Laranjo; MJ, Carvalho; AS, Pires; P, Moura; AM, Abrantes; CJ, Maia; MF, Botelho. *“Proteínas da membrana amniótica com efeito anti-cancerígeno: identificação e terapia combinada no carcinoma hepatocelular”*, Semana Digestiva 2014, Estoril, 2014 (Poster).

AC, Mamede; S, Guerra; M, Laranjo; AF, Brito; K, Santos; MJ, Carvalho; AM, Abrantes; P, Moura; JG, Tralhão; CJ, Maia; MF, Botelho. *“Hepatocellular carcinoma treatment with amniotic membrane proteins: effects on DNA”*, 4th PF2MUC Symposium, Coimbra, 2013 (Poster).



# Anexos



# Anexo A



Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE  
Unidade de Inovação e Desenvolvimento  
Centro de Ensaios Clínicos  
Telefone – 239 400477 Fax – 239 832241  
E-mail – gal@huc.min-saude.pt

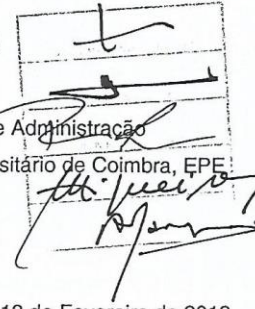
14.2

CHUC - Conselho de Administração

Approved

28.2.13

Exmo. Senhor  
Dr. José Martins Nunes  
Presidente do Conselho de Administração  
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE



ho CL  
28.2.13

Dr. José Martins Nunes  
Presidente do Conselho de Administração  
C.H.U.C. - EPE

Ref.º CHUC-70-12

Coimbra, 13 de Fevereiro de 2013

A pedido da Senhora Prof.ª Doutora Maria Filomena Botelho, recebeu esta Unidade um pedido de autorização de um Projecto de Investigação sobre **“A membrana amniótica como opção terapêutica: da oftalmologia ao cancro”**, ao qual não se aplicam as normas previstas na Lei nº 46/2004 de 19 de Agosto e colheu parecer favorável da Comissão de Ética deste Hospital.

Informa-se V. Exa. que este projecto não acarreta qualquer encargo financeiro adicional para o CHUC.

Solicita-se assim a autorização do Conselho de Administração para este Projecto.

Com os melhores cumprimentos,

O Director da Unidade de Inovação e Desenvolvimento

Prof. Doutor Pedro Monteiro

CHUC - EPE  
CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO  
Reg. N.º 8318/12 PCA  
Origem .....  
Data 20.2.2013

**\* Todos os Documentos devem estar em Português**

**NOTA:** Na apresentação do projecto de investigação (ensaio clínico ou outro) deverá ser constituído um "dossier" com separadores identificadores dos pontos previstos no modelo anexo. Esta documentação deve ser enviada também em suporte informático.

Gabinete de Apoio à Investigação

Secretariado - Ext. 13724

## Anexo B

**Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE**  
Unidade de Inovação e Desenvolvimento  
Centro de Ensaios Clínicos  
Telefone – 239 400477 Fax – 239 832241  
E-mail – gai@huc.min-saude.pt

### AUTORIZAÇÃO DE PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

ESTUDO Nº

CHUC	70	12
------	----	----

NOME DO PROJECTO:

“A membrana amniótica como opção terapêutica: da oftalmologia ao cancro”

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

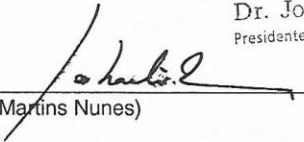
Senhora Profª. Doutora Maria Filomena Botelho

De acordo com a Legislação em vigor, é autorizada a realização, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, do Projecto de Investigação supracitado.

DATA: 28/2/13

Presidente do Conselho de Administração

Dr. José Martins Nunes  
Presidente do Conselho de Administração  
C.H.U.C. - EPE

  
(Dr. José Martins Nunes)

**\* Todos os Documentos devem estar em Português**

**NOTA:** Na apresentação do projecto de investigação (ensaio clínico ou outro) deverá ser constituído um "dossier" com separadores identificadores dos pontos previstos no modelo anexo. Esta documentação deve ser enviada também em suporte informático.

Gabinete de Apoio à Investigação

Secretariado - Ext. 13724