



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Beatriz Pessoa dos Santos

PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO COMO ABORDAGEM
TERAPÊUTICA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Dissertação no âmbito do Mestrado de Biotecnologia Farmacêutica,
com especialização em Oncobiologia orientada pela Professora
Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Professor
Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Beatriz Pessoa dos Santos

**PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO COMO ABORDAGEM
TERAPÊUTICA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Biotecnologia Farmacêutica, com especialização em Oncobiologia orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

*“Everybody is a Genius. But If You Judge a Fish by Its Ability to Climb a Tree, It Will Live Its Whole
Life Believing that It is Stupid.”*

Albert Einstein

Resumo

O carcinoma hepatocelular é o sétimo tipo de cancro mais incidente e o quarto com maior mortalidade em todo o mundo. A elevada taxa de mortalidade desta neoplasia primária do fígado deve-se ao facto de esta ser assintomática em estágios iniciais da doença, sendo assim diagnosticada em fases tardias onde a aplicação de estratégias terapêuticas é muito reduzida. Para além disso, as terapias disponíveis na prática clínica por vezes não têm a eficácia desejada e estão associadas a um grande número de efeitos adversos. Neste sentido, estudos têm demonstrado o plasma frio atmosférico como um tratamento inovador para vários tipos de cancro.

O plasma frio atmosférico (PFA), também conhecido pelo quarto estado físico da matéria, é um gás parcialmente ionizado, produzido a uma temperatura inferior a 40°C, e, portanto, pode ser aplicado em tecidos biológicos sem riscos de induzir lesão. Para além disso, tem demonstrado a capacidade de diminuir a proliferação celular de células tumorais sem induzir qualquer tipo de danos em células normais. Ainda assim, o seu mecanismo de ação não é conhecido. Estudos indicam que o efeito anti tumoral do plasma frio atmosférico possa estar relacionado com a produção de espécies reativas durante a descarga elétrica, no entanto, fatores físicos como radiação UV, campos eletromagnéticos e partículas carregadas não devem ser desconsiderados.

O principal objetivo desta dissertação foi, assim, avaliar o potencial terapêutico do plasma frio atmosférico no carcinoma hepatocelular.

Com essa finalidade, foi utilizado um dispositivo eletrónico capaz de gerar uma descarga de alta tensão para produzir Plasma Frio Atmosférico, desenvolvido no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Adicionalmente, foram utilizadas três linhas celulares representativas de carcinoma hepatocelular com diferentes perfis de expressão da proteína P53: HuH7, HepG2 e Hep3B. Para determinar a citotoxicidade do tratamento com PFA, as células foram submetidas a curtos períodos de exposição (15, 30, 60, 90 e 120 segundos). A atividade metabólica e o conteúdo proteico foram avaliados 24, 48 e 72h após o tratamento. Os ensaios subsequentes, referentes à viabilidade e perfil de morte celular, ciclo celular e potencial de membrana mitocondrial, foram realizados 48h após exposição ao PFA, para os tempos de exposição de 15, 60 e 120s. O mesmo se procedeu para os ensaios de avaliação das espécies reativas de oxigénio.

Após o tratamento com PFA, foi possível verificar uma diminuição da proliferação celular nas três linhas celulares em estudo, de uma forma dependente do tempo de exposição

e incubação à terapia, ainda assim, a linha HuH7 demonstrou uma maior sensibilidade ao tratamento. Foi também observado, para todas as linhas celulares, uma diminuição da viabilidade celular acompanhada por um aumento de morte celular por apoptose e necrose, sendo a necrose o tipo de morte mais predominante para os maiores tempos de exposição à terapia. Adicionalmente, foi verificado um bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, indicativo de perda da capacidade de replicação. Para além dos efeitos anteriormente referidos, a terapia com plasma frio atmosférico induziu ainda despolarização da membrana mitocondrial para o maior tempo de exposição, em todas as linhas celulares, sendo mais evidente na linha Hep3B. No que diz respeito às espécies reativas de oxigénio, foi possível observar uma diminuição do conteúdo intracelular de peróxidos para todas as linhas celulares em estudo. Foi também observado um aumento da concentração intracelular de radical superóxido para as linhas HepG2 e Hep3B, principalmente 2h após o tratamento, indicando que esta espécie pode ter influência no mecanismo de ação do plasma frio atmosférico.

Os resultados obtidos demonstram que, de facto, o plasma frio atmosférico induz um efeito anti proliferativo em linhas celulares de carcinoma hepatocelular. Ainda assim, é de reforçar a necessidade de um maior número de estudos, principalmente em modelos mais complexos, de maneira a permitir uma abordagem mais próxima da prática clínica.

Palavras-chave: Plasma Frio Atmosférico; Carcinoma Hepatocelular; Terapia para o cancro; Morte celular; Espécies Reativas de Oxigénio

Abstract

The Hepatocellular carcinoma is the seventh most common type of cancer and the fourth with the highest mortality worldwide. The high mortality rate of this primary liver neoplasm is due to the fact that it is an asymptomatic disease in its early stages, being thus diagnosed in later stages where the application of therapeutic strategies is very limited. Furthermore, the therapies available in clinical practice frequently do not have the desired efficacy and are associated with a large number of adverse effects. Therefore, studies have shown that atmospheric cold plasma can be used as an innovative treatment for various types of cancer.

Atmospheric cold plasma (AFP), also known as the fourth physical state of matter, is a partially ionized gas, that due to being produced at a temperature below 40°C can be applied to biological tissues without the risk of inducing damage. Furthermore, it has demonstrated the ability to decrease cell proliferation of tumour cells without inducing any type of damage to normal cells. Nevertheless, its mechanism of action is not known. Studies indicate that the anti-tumour effect of atmospheric cold plasma may be related to the production of reactive species during electrical discharge, however, physical factors such as UV radiation, electromagnetic fields and charged particles should not be disregarded.

The main objective of this dissertation was to evaluate the therapeutic potential of atmospheric cold plasma in hepatocellular carcinoma.

For this purpose, an electronic device capable of generating a high voltage discharge, developed at the Biophysics Institute of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra, was used to produce Atmospheric Cold Plasma. Additionally, three representative hepatocellular carcinoma cell lines with different P53 protein expression profiles were used: HuH7, HepG2 and Hep3B. To determine the cytotoxicity of the PFA treatment, the cells were subjected to short exposure periods (15, 30, 60, 90 and 120 seconds). Metabolic activity and protein content were evaluated 24, 48 and 72h after the treatment. The subsequent assays, referring to the viability and cell death profile, cell cycle and mitochondrial membrane potential, were carried out 48h after exposure to the PFA, for exposure times of 15, 60 and 120s. The same procedure was applied to evaluate the reactive oxygen species.

After treatment with PFA, it was possible to verify a decrease in cell proliferation in the three cell lines under study, which was dependent on the time of exposure and incubation to the therapy, even so, the HuH7 line showed greater sensitivity to the treatment. It was also observed, for all cell lines, a decrease in cell viability accompanied by an increase in cell death

due to apoptosis and necrosis, with necrosis being the most prevalent type of death for longer exposure times to therapy. Additionally, there was a blockage of the cell cycle in the G₂/M phase, which is indicative of a loss of replication capacity. In addition to the aforementioned effects, atmospheric cold plasma therapy also induced mitochondrial membrane depolarization for the longest exposure time in all cell lines, being more evident in the Hep3B line. Regarding to reactive oxygen species, it was possible to observe a decrease in the intracellular content of peroxides for all cell lines under study. An increase in the intracellular concentration of superoxide radicals was also observed for the HepG2 and Hep3B lines, mainly 2h after treatment, indicating that this species may have an influence on the mechanism of action of atmospheric cold plasma.

The results obtained demonstrate that, in fact, atmospheric cold plasma induces an anti-proliferative effect on hepatocellular carcinoma cell lines. Nonetheless, the need for a greater number of studies, especially in more complex models, is necessary in order to allow a closer approach to clinical practice.

Keywords: Atmospheric Cold Plasma; Hepatocellular Carcinoma; Cancer Therapy; Cell death; Oxygen Reactive Species

Agradecimentos

Embora pela sua finalidade académica uma dissertação constitua o culminar de uma etapa individual, é de salientar que a realização deste projeto não teria sido possível sem a colaboração e empenho de toda uma equipa multidisciplinar. A todos, que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram ao longo deste percurso, presto aqui os meus mais sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e diretora do Instituto de Biofísica da mesma instituição, por me ter recebido no laboratório de Biofísica, e ter permitido a realização desta dissertação. Agradeço por ter aceite ser minha orientadora, pelo tempo despendido na revisão e correção deste manuscrito, e por todo o conhecimento científico transmitido.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por, gentilmente, ter aceite ser orientador interno desta tese.

Aos Mestres Catarina Guilherme, Beatriz Serambeque e Inês Marques por todos os ensinamentos e conhecimento transmitidos e por toda a ajuda na realização do trabalho laboratorial. Um agradecimento sincero ao Mestre Ricardo Teixo, por me ter acolhido no grupo e ter mostrado sempre disponibilidade e paciência para me ajudar no que fosse necessário. Obrigada por me teres auxiliado ao longo deste ano e teres tornado possível a realização desta dissertação.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves agradeço a sua disponibilidade na realização dos estudos de citometria de fluxo.

Às minhas colegas de laboratório Ana e Gabriela, por toda a amizade e companheirismo. Um grande obrigada a vocês por todos os bons momentos passados, por toda a ajuda na realização dos ensaios e por todo o carinho e preocupação demonstrados.

À minha amiga Lúcia, por todo o apoio e motivação ao longo deste ano. Obrigada por seres o meu ombro amigo e por me teres sempre encorajado a ir mais longe. Por me fazeres rir mesmo sem motivo e por estares sempre lá quando precisei. A realização desta tese tornou-se muito mais fácil com a tua companhia, obrigada!

A todos os que me acompanharam durante o meu percurso académico, principalmente neste dois últimos anos.

Ao meu primo João por todas a gargalhas e abraços nos momentos menos felizes. Sem ti, o meu ano não teria sido tão animado, por isso, um grande obrigada.

À minha tia Ana Maria, por ter estado sempre presente ao longo deste ano. Obrigada por seres a pessoa cheia de garra que és e por me mostrares que sou capaz de ultrapassar qualquer obstáculo. Por ti fiz esta tese, e a ti ta dedico do fundo do coração.

Por último e mais importante, aos meus pais e ao meu irmão que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Obrigada por serem o meu exemplo de determinação, persistência e coragem. Por serem a minha luz ao fundo do túnel e por estarem sempre aqui para me ouvir e ajudar naquilo que preciso. Tudo aquilo que sou e tenho devo-o a vocês, por isso, para vocês vai o meu maior obrigada.

Lista de Abreviaturas

AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
AFBI	<i>Aflatoxina B1</i>
AFP	<i>Alfa-fetoproteína</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AQPs	<i>Aquaporinas</i>
Ar	<i>Árgon</i>
ARID	<i>AT-Rich Interaction Domain</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adenosina trifosfato</i>
AV	<i>Anexina-V</i>
AXINI	<i>Axin 1</i>
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
CAP	<i>Cold Atmospheric Plasma</i>
CCNA2	<i>Cyclin A2</i>
CCNE1	<i>Cyclin E1</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CHC	<i>Carcinoma hepatocelular</i>
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i>
CTP	<i>The Child-Turcotte-Pugh</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DBD	<i>Dielectric barrier discharge</i>
DCF	<i>2',7'-dichlorofluorescein</i>
DCFH	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein</i>
DCFH₂-DA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPC	<i>Des-gama-carboxiprotrombina</i>
DSB	<i>Double strand breaks</i>
E⁺	<i>Etídio</i>

EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FE-DBD	<i>Floating electrode dielectric barrier discharge</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FS	<i>Fosfatidilserina</i>
GSH	<i>Glutathiona reduzida</i>
H2AX	<i>H2A.X Variant Histone</i>
H₂O	<i>Água</i>
He	<i>Hélio</i>
ICD	<i>Immunogenic cell death</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
IL-8	<i>Interleucina 8</i>
IP	<i>Iodeto de propídeo</i>
IP₃R	<i>Inositol trisphosphate receptor</i>
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide</i>
JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
KEAP1	<i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i>
LI-RADS	<i>Liver imaging reporting and data system</i>
MAMs	<i>Mitochondria-associated endoplasmatic reticulum membranes</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MIFs	<i>Média das intensidades de fluorescência</i>
MLL	<i>Methyltransferases of the mixed-lineage leukaemia</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAFL	<i>Nonalcoholic Fatty Liver</i>
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular-trap</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO₂⁻	<i>Dióxido de nitrogénio</i>

NO₃⁻	Nitrato
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NRP	<i>Neuropilin</i>
O₂⁻	Radical Superóxido
OH[·]	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
P53	Proteína 53
P73	Proteína 73
PAS	<i>Plasma-activated solutions</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR-B	<i>Platelet-derived growth factor β</i>
PFA	Plasma frio atmosférico
PI3KCA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrossarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma vírus</i>
RBI	<i>Retinoblastoma protein 1</i>
RE	Retículo endoplasmático
RM	Ressonância magnética
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonuclease
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
RONS	<i>Reactive oxygen and nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPS6KA3	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase A3</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RYR	<i>Ryanodine receptor</i>
SMD	<i>Surface micro discharge</i>
SOD	Superóxido dismutase
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
TACE	<i>Transarterial Chemoembolization</i>
TARE	<i>Transarterial Radioembolization</i>

TC	Tomografia computadorizada
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TP53	Tumor protein 53 gene
TSC	<i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHD	Vírus da hepatite D
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
wtP53	P53 wild-type

Índice de Figuras

Figura 1 - Hallmarks do cancro.....	1
Figura 2 - Incidência de carcinoma hepatocelular de acordo com a etiologia e área geográfica..	6
Figura 3 - Alterações genéticas e epigenéticas características de carcinoma hepatocelular...	9
Figura 4 - Estratégias de tratamento para carcinoma hepatocelular.....	14
Figura 5 - Estados físicos da matéria.....	15
Figura 6 - Descarga de barreira dielétrica de eléctrodo flutuante (FE-DBD).....	17
Figura 7 - Jato de plasma.....	18
Figura 8 - Aplicações do plasma frio atmosférico e potenciais mecanismos do plasma.....	20
Figura 9 - Ilustração de duas estratégias distintas de aplicação do plasma frio atmosférico..	22
Figura 10 - Diferença de concentrações de RONS nas células normais e tumorais como princípio biológico para a seletividade dos tratamentos.....	25
Figura 11 - Diferente expressão de aquaporinas na membrana plasmática de células normais e tumorais como princípio biológico para a seletividade dos tratamentos.....	26
Figura 12 - Mecanismos moleculares responsáveis pela eficácia do tratamento com PFA...	30
Figura 13 - Representação da interação anexina-V e iodeto de propídeo com os diferentes tipos de populações celulares - ..	44
Figura 14 - Atividade metabólica após exposição ao tratamento com PFA.....	54
Figura 15 - Conteúdo proteico após exposição ao tratamento com PFA.....	60
Figura 16 - Viabilidade celular após exposição ao tratamento com PFA.....	66
Figura 17 - Análise morfológica da linha celular HuH7.....	69
Figura 18 - Análise morfológica da linha celular HepG2.....	70
Figura 19 - Análise morfológica da linha celular Hep3B.....	72
Figura 20 - Alterações no ciclo celular após exposição ao tratamento com PFA.....	74
Figura 21 - Potencial de membrana mitocondrial após exposição ao tratamento com PFA.....	76
Figura 22 - Conteúdo intracelular de peróxidos após exposição ao tratamento com PFA.....	78
Figura 23 - Conteúdo intracelular de radical superóxido após exposição ao tratamento com PFA.....	82

Índice de Tabelas

Tabela I – Sistema Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) para estadiamento de carcinoma hepatocelular..	II
---	-----------

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Lista de Abreviaturas	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xii
1. Introdução	xv
1.1. Cancro.....	1
1.2. Carcinoma Hepatocelular	2
1.2.1. Epidemiologia.....	2
1.2.2. Fatores de risco	3
1.2.3. Fisiopatologia	6
1.2.4. Diagnóstico	9
1.2.5. Tratamento	10
1.3. Plasma Frio Atmosférico	14
1.3.1. Plasma.....	14
1.3.2. Produção de plasma.....	16
1.3.3. Aplicações biomédicas.....	19
1.3.4. Aplicações em Oncologia	21
1.3.5. Seletividade do PFA para células malignas	23
1.3.6. Mecanismos de ação do plasma frio atmosférico.....	26
1.3.7. PFA e indução de resposta imune	30
2. Objetivos.....	33
3. Materiais e Métodos.....	37
3.1. Culturas Celulares	39
3.2. Dispositivo de Plasma Frio Atmosférico	40

3.2.1.	Tratamento com Plasma Frio Atmosférico	40
3.3.	Estudos de Citotoxicidade.....	41
3.3.1.	Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de MTT	41
3.3.2.	Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio do SRB.....	42
3.4.	Viabilidade e morte celulares.....	43
3.5.	Avaliação do ciclo celular.....	45
3.6.	Avaliação do potencial da membrana.....	46
3.7.	Espécies reativas de oxigênio.....	47
3.7.1.	Análise do conteúdo intracelular de peróxidos	47
3.7.2.	Análise do conteúdo intracelular de radical superóxido.....	47
3.8.	Análise morfológica.....	48
3.9.	Análise Estatística.....	49
4.	Resultados	39
4.1.	Estudos de Citotoxicidade.....	53
4.1.1.	Atividade metabólica.....	53
4.1.2.	Conteúdo proteico	59
4.2.	Viabilidade e perfil de morte celular	65
4.3.	Análise morfológica.....	68
4.4.	Ciclo celular	73
4.5.	Potencial de membrana mitocondrial	76
4.6.	Espécies reativas de oxigênio.....	77
4.6.1.	Conteúdo intracelular de peróxidos.....	77
4.6.2.	Conteúdo intracelular de radical superóxido.....	81
5.	Discussão.....	85
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras	95
7.	Referências Bibliográficas	99

Capítulo I

Introdução

I.1. Cancro

O cancro, uma das principais causas de morte em todo o mundo, define-se como uma, ou várias doenças, caracterizadas pelo desenvolvimento de células anormais que se dividem descontroladamente e que têm a capacidade de se infiltrar e destruir tecidos saudáveis (Fior, 2019).

A investigação científica, na área da oncobiologia, tem evoluído no sentido de compreender os mecanismos subjacentes à formação do tumor, de maneira a encontrar novos métodos mais eficazes para o seu tratamento. Um tumor não deve ser visto como uma massa celular isolada. Deve sim, ser visto como um tecido complexo, composto por vários tipos de células distintas que interagem entre si, formando o microambiente tumoral (Fior e Zilhão, 2019). À medida que estas células evoluem para um estado de neoplasia, adquirem características moleculares, bioquímicas e celulares, denominadas de *hallmarks* do cancro, que lhes conferem vantagens no crescimento (Figura 1).

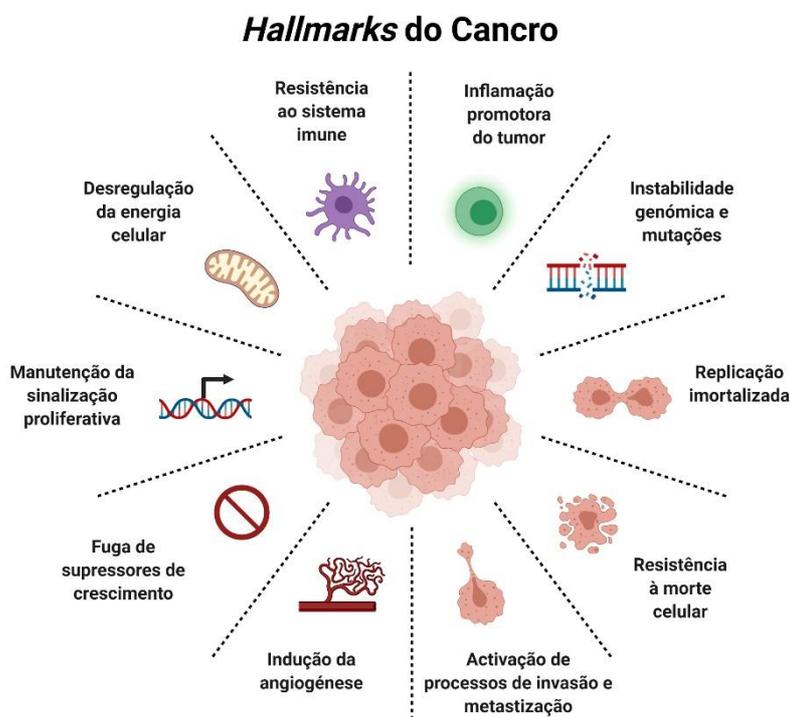


Figura 1- Hallmarks do cancro. Características e capacidades adquiridas pelas células tumorais durante o processo neoplásico, que lhes conferem vantagens a nível do crescimento e replicação. Adaptado de (Hanahan e Weinberg, 2011). Criado com BioRender.com.

Definidos pela primeira vez em 2000 por Hanahan e Weinberg, estes incluem: manutenção da sinalização proliferativa, insensibilidade a sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação imortalizada, indução da angiogénese, invasão inicial e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000). Numa posterior atualização foram ainda englobadas outras capacidades como a inflamação promotora do tumor, a instabilidade genómica e mutações, a desregulação da energia da célula e a evasão ao sistema imune (Fouad e Aanei, 2017; Hanahan e Weinberg, 2011).

I.2. Carcinoma Hepatocelular

I.2.1. Epidemiologia

O carcinoma hepatocelular (CHC) representa 90% das neoplasias primárias do fígado, e é o quinto cancro mais comum nos homens e o nono nas mulheres, registando mais de 700 000 novos casos/ano e 600 000 mortes/ano a nível mundial (Kim e Viatour, 2020; Sagnelli *et al.*, 2020). De acordo com a GLOBOCAN, estima-se que no ano de 2020 tenham ocorrido 905 677 novos casos e 830 180 mortes por CHC em todo o mundo (Sung *et al.*, 2021).

Em Portugal, a taxa de incidência desta patologia é relativamente baixa comparativamente a outros tipos de cancro, representando apenas 6,1% de todos os tipos de cancro diagnosticados (1550 casos em 2020). Quando à mortalidade, é responsável por 5,8% de todas as mortes relacionadas com cancro (1518 mortes em 2020) (Sung *et al.*, 2021).

As taxas de incidência e de mortalidade do CHC variam de acordo com a região geográfica e como o status socioeconómico (Kim e Viatour, 2020). Este tipo de neoplasia hepática predomina essencialmente em países onde os cuidados de saúde são limitados, como a China e outros países do Sudeste da Ásia e África Subsaariana, em indivíduos com idades entre os 30 e os 60 anos. Por outro lado, baixas incidências de carcinoma hepatocelular ocorrem em países do norte da Europa, Médio Oriente, Oceânia, América do Norte e América do Sul onde, por norma, se desenvolve em doentes com mais de 60 anos (Gomes *et al.*, 2013; Sagnelli *et al.*, 2020). Recentemente, tem-se verificado uma tendência para o aumento da incidência de carcinoma hepatocelular nas regiões estabelecidas como de baixa incidência, tais como os Estados Unidos da América e algumas partes da Europa (Llovet *et al.*, 2021).

Quanto à população afetada, sabe-se que o carcinoma hepatocelular é mais frequente em homens do que mulheres, verificando-se uma proporção de homens para mulheres de aproximadamente 2,4 (Kim e Viatour, 2020). Estudos sugerem que isto se deve ao facto de o estrogénio prevenir o CHC e o androgénio o promover (Carruba, 2021). Para além disso, pensa-se que a inibição da IL-6 mediada pelo estrogénio possa ser um mecanismo no qual o estrogénio exerce um efeito protetor contra o CHC. Também a reduzida secreção de adiponectina nos homens, durante a puberdade, é relatada como uma possível causa do alto risco de cancro do fígado nos homens (Kim e Viatour, 2020).

1.2.2.Fatores de risco

Na maioria dos casos, mais de 90%, o CHC desenvolve-se no seguimento de doença crónica do fígado, sendo que os principais fatores etiológicos são infeções pelo vírus da hepatite B (VHB) ou de hepatite C (VHC), consumo excessivo de álcool, exposição à aflatoxina B1, fumo do tabaco e doença hepática não alcoólica (NAFLD, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) causada por doenças metabólicas como obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Kim e Viatour, 2020; Llovet *et al.*, 2021; Petruzzello, 2018).

Embora a contribuição das diferentes etiologias para o desenvolvimento deste tumor primário do fígado varie de região para região, sabe-se que a infeção por VHB é a principal causa de incidência e de morte por CHC a nível global (Kim e Viatour, 2020).

O VHB é um vírus de DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) que consegue integrar o genoma do hospedeiro induzindo a ativação de oncogenes responsáveis por transformações celulares malignas e a inativação de genes supressores tumorais (Llovet *et al.*, 2021; Sagnelli *et al.*, 2020). A sua transmissão tende a ocorrer de um modo vertical e perinatal em regiões endémicas, sendo que em áreas de baixa prevalência é predominantemente horizontal (feridas abertas, transfusões de sangue, transmissões sexuais, entre outros). Globalmente, é responsável por cerca de 80% dos casos de CHC associados a infeções virais, especialmente na África e no Leste da Ásia, regiões onde a taxa de incidência desta neoplasia é elevada. Estima-se que, dos cerca de 400 milhões de pessoas cronicamente infetadas com o VHB, em todo o mundo, um quarto irá desenvolver a doença com um risco 15-20 vezes maior, comparativamente à população não infetada (Petruzzello, 2018).

Para além disso, o risco de carcinoma hepatocelular entre portadores de VHB parece aumentar na dependência de vários fatores: demográficos (sexo masculino, idade avançada, etnia, história familiar de CHC), virais (alta carga viral, genótipo, maior duração da infeção,

coinfecção com VHC, vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou vírus da hepatite D (VHD)), clínicos (presença de esteatose ou de cirrose hepáticas) e ambientais (exposição à aflatoxina, uso abusivo de álcool ou de tabaco) (Petruzziello, 2018; Sagnelli *et al.*, 2020). Doentes com cirrose hepática parecem ter um maior risco de desenvolver a doença, uma vez que o VHB aumenta o risco de carcinoma em fígados cirróticos. Dados indicam que doentes com cirrose relacionada com o VHB têm 31 vezes mais risco de desenvolver CHC (Sagnelli *et al.*, 2020). No entanto, este vírus é também considerado a principal causa de CHC na ausência de cirrose (Petruzziello, 2018).

Tal como referido anteriormente, a infeção por VHC é também um dos principais fatores etiológicos do CHC. Contrariamente ao VHB, o VHC é um vírus de RNA que não integra o genoma do hospedeiro e, por isso, o risco de desenvolver CHC ocorre principalmente em indivíduos que desenvolvam cirrose ou lesão hepática crónica com fibrose (Llovet *et al.*, 2021). A infeção por VHC é o principal fator etiológico em áreas de baixa incidência, tais como a Europa Ocidental e a América do Norte, e está relacionada com cerca de 20% de todos os casos de carcinoma hepatocelular (Petruzziello, 2018).

A coinfecção de VHB/VHC acredita-se ser também um dos fatores contribuintes para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Estudos demonstram que, comparativamente a doentes mono-infetados, indivíduos co-infetados com VHB/VHC têm uma maior probabilidade de desenvolver cirrose e uma maior incidência de carcinoma hepatocelular (Konstantinou e Deutsch, 2015). Por outro lado, há evidências que demonstram que, de facto, doentes co-infetados com VHB/VHC apresentam um maior risco de cirrose, mas não necessariamente de carcinoma hepatocelular (Grewal *et al.*, 2018). Também doentes portadores de VHB ou VHC co-infetados com VIH, vírus da imunodeficiência humana, parecem ser mais suscetíveis a desenvolver CHC, uma vez que a persistência destes vírus pode estar associada ao aumento da hepatotoxicidade causada pela terapia anti-VIH. Porém, os mecanismos de hepatocarcinogénese nestes doentes ainda não estão totalmente esclarecidos (Hu, Liu e Luo, 2019; Sagnelli *et al.*, 2020).

Para além da infeção pelos vírus da hepatite, existem ainda fatores ambientais, como a exposição à aflatoxina B1 (AFB1), igualmente capazes de aumentar o risco de carcinoma hepatocelular. A AFB1, uma micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus*, é normalmente ingerida em alimentos contaminados, na Ásia e em regiões tropicais da África. Quando metabolizada, induz mutações no DNA, nomeadamente no codão 249 do gene *TP53*, responsáveis por uma diminuição da sua função supressora tumoral. Estudos relatam que

a exposição à aflatoxina BI e infecção por VHB parecem ter um efeito sinérgico no desenvolvimento de CHC (Kim e Viatour, 2020; Llovet *et al.*, 2016).

Também o álcool e o tabaco podem contribuir para o CHC. Por si só, o álcool não tem um efeito mutagênico. No entanto, o seu consumo excessivo induz alterações no metabolismo do fígado que, juntamente com uma dieta desequilibrada, podem levar ao desenvolvimento de hepatite alcoólica, fibrose hepática e, finalmente, cirrose com progressão para CHC (Kim e Viatour, 2020; Sagnelli *et al.*, 2020). Atualmente, existe um número crescente de pessoas com cirrose devido ao consumo de álcool. Porém, o consumo crônico de álcool pode também aumentar o risco de CHC de outras etiologias. Vários estudos têm vindo a demonstrar um aumento do risco de CHC para doentes portadores de VHB que consomem álcool comparativamente àqueles que não consomem (Llovet *et al.*, 2021). Quanto ao tabaco, estudos demonstram que indivíduos que fumam, têm um risco acrescido de 55% para CHC, uma vez que o tabaco induz carcinogénese e contribui para uma aceleração de fibrose no fígado (Kim e Viatour, 2020).

Outro fator etiológico comum de CHC é a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) (Kim e Viatour, 2020). A NAFLD representa uma condição de acumulação excessiva de gordura no fígado de pessoas que consomem álcool em quantidades abaixo dos níveis de risco. Contudo, esta condição pode ser limitada ao excesso de gordura no fígado, fígado gordo não alcoólico (NAFL, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver*), ou pode progredir para necroinflamação e fibrose, esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês *nonalcoholic steatohepatitis*), cirrose e, eventualmente, carcinoma hepatocelular. Estudos evidenciam que doentes com NAFLD que apresentem um elevado grau de fibrose, têm um risco 7 vezes maior de desenvolver CHC, que pode ainda ser agravado na presença de *diabetes mellitus* tipo 2 e de obesidade (Petroni *et al.*, 2021).

Por fim, sabe-se também que algumas doenças metabólicas causadas por resistência à insulina, hiperinsulinemia, remodelação do tecido adiposo, alteração da flora intestinal, aumento do retículo endoplasmático, e stresse oxidativo, podem contribuir para o desenvolvimento de CHC (Nishida, 2021) (Figura 2).

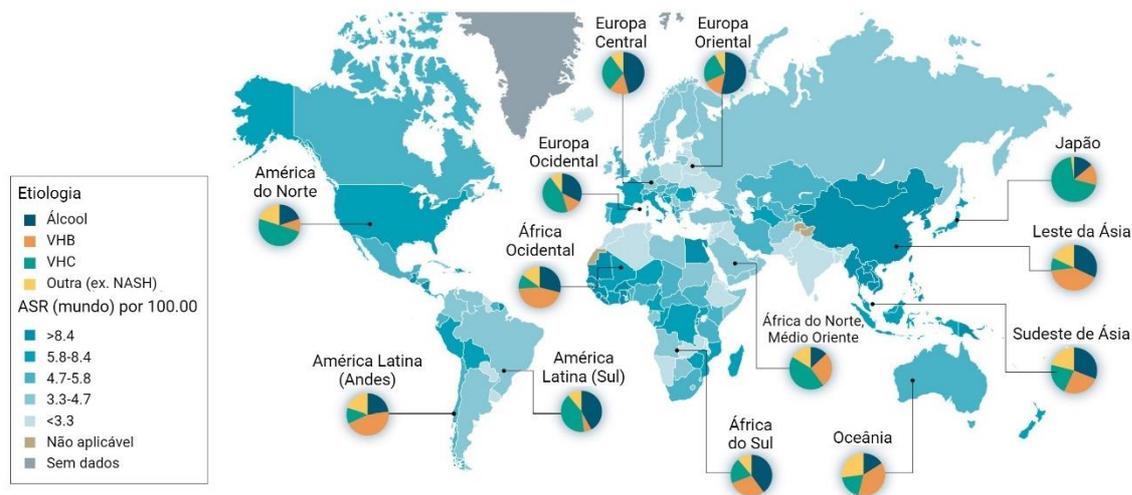


Figura 2 - Incidência de carcinoma hepatocelular de acordo com a etiologia e área geográfica. Altas incidências de CHC verificam-se no Leste da Ásia sendo a Mongólia o país com maior incidência. O vírus da hepatite B é o principal fator etiológico de CHC nesta região. ASR, age-standardized incidence rate (taxa de incidência padronizada por idade). Adaptado de (Llovet *et al.*, 2021). Criado com BioRender.com.

1.2.3. Fisiopatologia

O desenvolvimento de CHC, semelhante a outras neoplasias, é um processo complexo, multifaseado, resultante de múltiplas alterações genéticas e moleculares, que podem dar origem a transformações malignas. Essas alterações ocorrem, normalmente, em contexto de cirrose, resultantes de uma sequência progressiva de carcinogênese hepática, que começa com nódulos regenerativos que evoluem para nódulos displásticos e, possivelmente, CHC. Ainda assim, podem também ocorrer em fígados não cirróticos devido a outros fatores de risco como infecções virais por VHB, VHC ou até mesmo contraceção oral feminina (Llovet *et al.*, 2016, 2021; Moawad *et al.*, 2020).

Avanços na biologia molecular, nomeadamente nas estratégias de sequenciação de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*), têm permitido a identificação de alguns genes e vias de sinalização alteradas em doentes com CHC (Chiba *et al.*, 2017).

Dos genes mutados, assume especial importância o gene *TERT*, codificante da telomerase. Mutações no promotor deste gene têm sido recentemente identificadas como as alterações genómicas somáticas mais frequentes e mais iniciais em doentes com CHC, representado mais de 50% dos casos (Shibata, 2021). A telomerase é uma enzima crítica no processo de replicação das extremidades dos cromossomas. Quando reativada, devido a mutações no promotor *TERT*, previne o encurtamento dos telómeros dos cromossomas, conferindo às células tumorais a capacidade de se dividirem descontroladamente. A reativação

da telomerase pode ainda ocorrer devido a inserções virais ou a ampliações (Chiba *et al.*, 2017; Kim e Viatour, 2020; Llovet *et al.*, 2021; Shibata, 2021).

A ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina é também muito frequente em doentes com carcinoma hepatocelular, representando 30-50% dos casos. Esta via de sinalização canónica é altamente conservada ao longo da evolução e tem um papel chave na regulação do desenvolvimento de tecidos e na manutenção da homeóstase. Mutações nos genes *CTNNB1* (codificante da β -catenina), *AXIN1* ou *APC* (inibidores da via Wnt), previnem a degradação de β -catenina, levando a uma ativação aberrante desta via de sinalização. Assim, promovem o desenvolvimento de diferentes doenças do fígado, incluindo cancro (He e Tang, 2020; Kim e Viatour, 2020; Llovet *et al.*, 2016, 2021).

No que diz respeito ao ciclo celular, são várias as mutações que levam ao seu comprometimento. A mutação no gene *TP53* é das mais reportadas em casos de CHC, representando cerca de 30%. A P53 é uma proteína de supressão tumoral que regula o ciclo celular, a apoptose e a senescência em resposta ao stresse celular. A inativação do gene que codifica esta proteína, o gene *TP53*, está normalmente associada a mutações no domínio de ligação do DNA, e ocorre particularmente em casos de CHC relacionados com infeção por VHB e exposição à aflatoxina B1. Para além destas, deleções de outros genes supressores tumorais tais como *CDKN2A* e *RBI*, estão descritas em 5-20% dos casos. Recentemente, foi também identificado que a sobre-expressão de genes ciclina *CCNA2* e *CCNE1*, induzida por inserções virais e rearranjos cromossómicos, são responsáveis por 7% dos tumores (Khemlina, Ikeda e Kurzrock, 2017; Kim e Viatour, 2020; Zucman-Rossi e Naultand, 2020).

Outras alterações menos frequentes em doentes com CHC, são as alterações nas vias do stresse oxidativo e nas vias RAS/RAF/MAP e AKT/mTor, representando 5 a 15% e menos de 10% dos casos, respetivamente. Alguns estudos relatam que a via do stresse oxidativo é ativada por mutações que ativam o fator transcricional NRF2 (codificado pelo gene *NFE2L2*), ou deleções do gene codificante do inibidor desta via, *KEAP1*. A ativação da via NRF2/KEAP1 protege as células tumorais da toxicidade gerada por espécies reativas de oxigénio, promovendo o crescimento do tumor (Kim e Viatour, 2020; Zucman-Rossi e Naultand, 2020). Quanto às vias de sinalização RAS/RAF/MAP e AKT/mTor, estas são ativadas por alterações genéticas raras, incluindo mutações que induzem a inativação dos genes *RPS6KA3*, *PTEN*, *TSC1* e *TSC2* e mutações que induzem ativação do gene *PI3KCA* (Zucman-Rossi e Naultand, 2020).

Adicionalmente, variantes em genes envolvidos na remodelação da cromatina tais como o gene *ARID1A* ou o *ARID2* e genes de regulação da histona metiltransferase tais como

o *MLL*, o *MLL2*, o *MLL3* e o *MLL4* têm sido reportadas em casos de CHC (Rebouissou e Nault, 2020; Zucman-Rossi e Naultand, 2020).

Existe ainda uma outra característica, a angiogénese induzida pelo tumor, que é também fundamental ao desenvolvimento de CHC. A angiogénese é um processo altamente regulado, com interações equilibradas entre fatores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos que, em situações normais, permitem a expansão e a remodelação da rede vascular embrionária primária (Moawad *et al.*, 2020). Em situações de patologia, este equilíbrio fica comprometido devido à sobre-expressão de fatores angiogénicos e inibição de fatores anti-angiogénicos, levando a um aumento do desenvolvimento tumoral com vasos sanguíneos anormais. O conhecimento destes fatores angiogénicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*) e os recetores neuropilina (NRP, do inglês *neuropilin receptors*), tem sido fundamental no desenvolvimento de novas terapias (Moawad *et al.*, 2020). O VEGF, por exemplo, que normalmente se encontra expresso em baixos níveis, em 91% dos casos de CHC avançado apresenta uma elevada expressão. A ligação de VEGF-A, (isoforma responsável pela angiogénese e pela remodelação vascular), aos seus recetores correspondentes, os recetores tirosina/quinase (VEGFR 1-3), estimula a transdução de sinais que levam a proliferação e a migração de células endoteliais, conferindo vantagens ao tumor (Khemlina, Ikeda e Kurzrock, 2017; Moawad *et al.*, 2020). Os mecanismos referidos anteriormente encontram-se esquematizados na Figura 3.

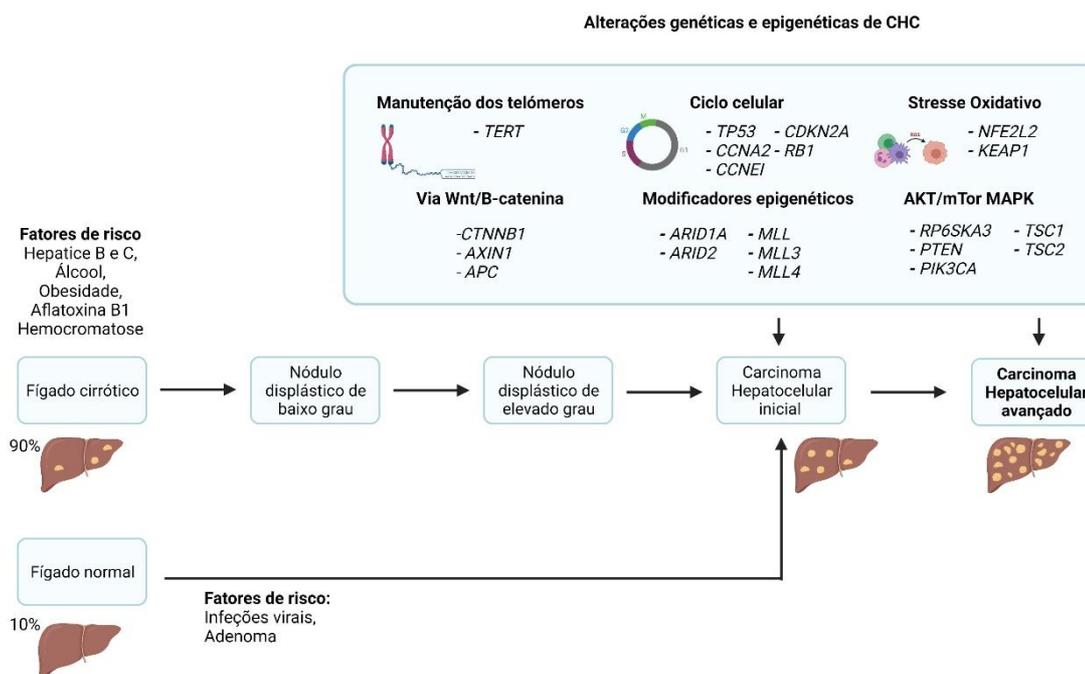


Figura 3 - Alterações genéticas e epigenéticas características de carcinoma hepatocelular. O desenvolvimento de carcinoma hepatocelular é um processo multifaseado que pode ser desencadeado num fígado cirrótico devido a fatores de risco como álcool e obesidade, podendo também ocorrer em fígado normal devido a infeções virais ou toma de contraceptivos orais femininos. Ao longo deste processo ocorrem mutações em vários genes que comprometem vias de sinalização essenciais ao bom funcionamento das células. Estas alterações conferem ao CHC capacidades proliferativas e de resistência. Baseado em (Llovet *et al.*, 2016; Rebouissou e Nault, 2020). Criado com BioRender.com.

1.2.4. Diagnóstico

O carcinoma hepatocelular é caracterizado por um prognóstico pouco favorável, uma vez que em fases iniciais da doença, onde poderiam ser aplicadas estratégias terapêuticas curativas, a maioria dos casos é assintomático e, por isso, dificilmente diagnosticado. Assim, o diagnóstico de doentes com esta neoplasia tende a ocorrer em fases mais avançadas da doença, nas quais as opções terapêuticas são, muitas vezes, limitadas (Ozkan *et al.*, 2021).

Neste sentido, a Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado (AASLD, do inglês *American Association for the Study of Liver Diseases*) e a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL, do inglês *European Association for the Study of the Liver*) implementaram programas de vigilância globais, com foco nos países em desenvolvimento, onde a taxa de incidência de CHC é elevada, com o objetivo de detetar os tumores numa fase mais inicial, na qual os doentes apresentem um melhor prognóstico (Adeniji e Dhanasekaran, 2021; Llovet *et al.*, 2021; Singal, Lampertico e Nahon, 2020; Yang e Heimbach, 2020). Dado que a maioria dos casos de CHC ocorre em populações de doentes de risco, com cirrose ou com hepatite B crónica, são estes que devem ser elegíveis para estes programas, com monitorização regular (Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021).

Dos métodos utilizados para a vigilância, assume especial importância a ecografia com ou sem avaliação dos níveis séricos de alfa-fetoproteína (AFP). A ecografia, técnica de diagnóstico que permite a detecção de nódulos hepáticos, é um procedimento facilmente tolerado pelos doentes e apresenta uma sensibilidade de 58 a 80%, quando realizado por um profissional (Ozkan *et al.*, 2021). Por sua vez, a avaliação dos níveis séricos de alfa-fetoproteína, marcador tumoral presente no plasma que se encontra elevado em situação de patologia, pode levar a resultados inconclusivos. Estudos demonstram que os níveis desta proteína podem encontrar-se normais em cerca de 40% dos casos de doentes com CHC numa fase inicial (Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021). A combinação destas duas técnicas de diagnóstico aumenta a taxa de detecção da doença numa fase inicial. Todavia, surge ainda a necessidade de pesquisa de novos marcadores tumorais mais precisos que a AFP. Um exemplo destes marcadores é a des-gama-carboxi protrombina (DCP), uma proteína que se encontra com elevados níveis em mais de 35% dos doentes com CHC inicial (Ozkan *et al.*, 2021).

Não sendo suficientes os métodos de diagnóstico acima referidos, devido às suas limitações, este tipo de cancro requer ainda técnicas de imagem tais como a tomografia computadorizada (TC) com contraste ou a ressonância magnética (RM), para um diagnóstico definitivo. Estas técnicas apresentam valores de sensibilidade e de especificidade favoráveis, sendo de 81% e 93% para a TC e de 91% e 95% para a RM, respetivamente. No entanto, a TC apresenta algumas desvantagens para os doentes devido à exposição a radiação ionizante (Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021).

Para além dos métodos de diagnóstico convencionais, surgiu, em 2011, um sistema estandardizado para interpretação de lesões do fígado. Este sistema, denominado LI-RADS, do inglês *liver imaging reporting and data system*, permite a classificação das lesões do fígado em 5 categorias, sendo as lesões LR-1 benignas e as LR-5 conclusivas de CHC. Contudo apresenta algumas limitações como a não caracterização de lesões atípicas de perfil vascular e a não aplicação em fígados não cirróticos. Nestes casos deve recorrer-se a um diagnóstico mais invasivo para os doentes, como as biopsias (Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021; Yang e Heimbach, 2020).

I.2.5. Tratamento

Após o diagnóstico, os tratamentos são atribuídos aos doentes de acordo com o estágio da doença, seguindo sistemas de estadiamento como o algoritmo BCLC (do inglês *Barcelona Clinic Liver Cancer*). A tabela seguinte (Tabela I) apresenta o sistema BCLC atualizado.

Tabela I – Sistema Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) para estadiamento de carcinoma hepatocelular. Baseado em (Ozkan *et al.*, 2021).

BCLC			
Estádio	Desenvolvimento tumoral	Função hepática (score CTP)	Score ECOG
0 (muito inicial)	nódulo único <2cm	Child-Pugh A	
A (inicial)	nódulo único <3cm ou três nódulos <3cm		0
B (intermédio)	tumor multinodular	Child-Pugh A e B	
C (avançado)	invasão da veia porta e metástases		1-2
D (terminal)	doença extensa	Child-Pugh C	3-4

Este sistema, publicado pela 1ª vez em 1999, permite uma estratificação dos tratamentos de acordo com o desenvolvimento tumoral, o grau de disfunção do fígado e o estado do doente de acordo com o ECOG (do inglês *Eastern Cooperative Oncology Group*). Assim, é possível distinguir 5 estádios, desde o estágio 0, que caracteriza um estágio muito inicial de doença, até ao estágio D, que representa um estágio terminal (Llovet, Brú e Bruix, 1999; Ozkan *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2019; Yang e Heimbach, 2020).

O tratamento atribuído a cada doente tem como principal objetivo aumentar a sua qualidade de vida. Para estádios mais iniciais de doença opta-se por tratamentos curativos enquanto que numa fase terminal são os tratamentos paliativos os mais adequados (Ozkan *et al.*, 2021).

As terapias curativas são normalmente atribuídas a doentes com estádios de 0 a A seguindo o BCLC, e incluem ressecção hepática, transplante hepático e ablação. De entre as opções terapêuticas referidas, o transplante hepático é a terapia mais eficaz, pois permite melhores resultados em doentes cirróticos com CHC inicial, comparativamente às outras opções (Sapisochin e Bruix, 2017). Esta técnica oferece uma elevada taxa de sobrevivência, superior a 70% após cinco anos, sendo que também apresenta taxas de recorrência relativamente baixas, de cerca de 10 a 18%. No entanto, apresenta algumas limitações uma vez que esta terapia só deve ser aplicada a doentes com CHC que apresentem tumores isolados de dimensões inferiores a 5 cm, ou até 3 nódulos com menos de 3 cm cada, sem invasão vascular (Llovet *et al.*, 2021). Para além disso, apenas uma pequena porção de doentes pode ser submetido a este tipo de tratamento dado que a disponibilidade e a compatibilidade

de órgãos é muito reduzida (Llovet *et al.*, 2021; Sapisochin e Bruix, 2017; Yang e Heimbach, 2020).

Uma outra opção terapêutica curativa é a ressecção hepática. Esta terapia é normalmente atribuída a doentes com CHC numa fase inicial, sem hipertensão portal ou altos níveis de bilirrubina no plasma, sendo contraindicada para doentes com cirrose descompensada e/ou com invasão vascular. Embora a taxa de sobrevivência seja bastante favorável, de cerca de 60 a 70%, a recorrência de CHC após ressecção hepática permanece o maior obstáculo, sendo de 70% após 5 anos, mesmo em doentes com um único tumor de dimensão inferior a 2 cm (Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021; Vibert, Schwartz e Olthoff, 2020; Yang e Heimbach, 2020).

Para além das duas abordagens referidas, existe ainda uma outra, denominada de ablação. A ablação é uma terapia minimamente invasiva que pode ser feita através de radiofrequência, micro-ondas, frio, injeção alcoólica ou laser. É atribuída a doentes em estádios de 0 a A, não elegíveis para cirurgia, devido a elevada pressão portal, localização anatómica do tumor ou outras comorbilidades, e tem como principal objetivo a indução de necrose tumoral através de alterações de temperatura. É um procedimento seguro, com taxa de mortalidade inferior a 0,5% e apresenta taxas de sobrevivência e de recorrência muito semelhantes às da ressecção hepática (Granata *et al.*, 2021; Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021).

Na impossibilidade de optar por tratamentos curativos devido à gravidade do tumor e à condição de saúde dos doentes, os tratamentos não curativos, como terapia locorregional e terapia sistémica, são os mais utilizados (Ozkan *et al.*, 2021).

Considerando a terapia locorregional, são várias as abordagens que podem ser feitas: a quimioembolização transarterial, a radioembolização transarterial e a radioterapia estereotáxica corporal. A quimioembolização transarterial, também denominada de TACE (do inglês *Transarterial Chemoembolization*), é um procedimento que tem como objetivo a desvascularização das células tumorais através da injeção de fármacos citotóxicos e partículas de embolização, na artéria que alimenta o tumor. Alguns agentes quimioterápicos como a doxorrubicina, a cisplatina e a mitomicina, em combinação com lipiodol são administrados na artéria hepática induzindo isquemia nas células tumorais, citotoxicidade e, conseqüentemente, necrose (Chen *et al.*, 2020; Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021).

Quanto à radioembolização transarterial (TARE, do inglês *Transarterial Radioembolization*), é uma terapia altamente direcionada para o fígado, que utiliza a injeção de microesferas radioativas ou radiolipiodol para induzir necrose do tumor. É indicada para doentes com classificação BCLC-B e, ao contrário de outros procedimentos radiológicos, esta

intervenção pode ser feita em doentes com trombose da veia porta ou com elevado desenvolvimento tumoral. O benefício causado por este procedimento é muito semelhante ao verificado com a TACE, embora demonstre menos citotoxicidade e uma sobrevida livre de doença mais longa (Chen *et al.*, 2020; Llovet *et al.*, 2021; Ozkan *et al.*, 2021).

Dentro das terapias radiológicas existe ainda uma outra técnica denominada de radioterapia estereotáxica corporal. Adequada para o tratamento de doentes com tumores irressecáveis e com trombose da veia porta, ou com metástases extra-hepáticas, esta terapia tem vindo a demonstrar a sua eficácia e segurança. Apesar de provocar benefícios na palição de doentes sintomáticos com metástases, sabe-se que a doença hepática, possivelmente induzida pela radiação, é uma complicação associada a esta terapia que pode ser fatal para 5 a 13% dos casos (Ozkan *et al.*, 2021; Yang e Heimbach, 2020).

No que diz respeito à terapia sistémica, esta é apenas implementada em doentes em estágio de doença avançado que não sejam elegíveis para terapias direcionadas para o fígado, como as anteriormente mencionadas, ou não sejam bons candidatos a cirurgia hepática (Ozkan *et al.*, 2021). O primeiro medicamento a ser aprovado, em 2007, como terapia de 1ª linha foi o sorafenib, um inibidor dos recetores de fatores de crescimento endoteliais vasculares pró-angiogénicos VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 1, 2 e 3*), do fator de crescimento derivado de plaquetas β (PDGFR- β , do inglês *platelet-derived growth factor β*) e da família de quinases RAF (do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma*) (Kim e Viatour, 2020). Desde então, têm-se descoberto fármacos mais seguros e com menos efeitos adversos, tais como os anticorpos atezolizumab (anticorpo anti-PDL1) e o bevacizumab (anticorpo anti-VEGF). A terapia combinada destes anticorpos promove uma maior tolerabilidade por parte dos doentes, assim como um aumento da sobrevivência média comparativamente ao sorafenib (Llovet *et al.*, 2021).

Adicionalmente, existem terapias de 2ª linha tais como o regorafenib, o cabozantinib e o ramucirumab, aprovadas para o tratamento de CHC avançado, para doentes com progressão da doença após o sorafenib (Ozkan *et al.*, 2021).

Numa fase terminal da doença, na qual os doentes apresentam um quadro clínico muito agravado sem possibilidade de tratamento, opta-se por tratamentos paliativos de maneira a melhorar a sua qualidade de vida (Llovet *et al.*, 2021). A Figura 4 apresenta, esquematicamente, as estratégias de tratamento para o carcinoma hepatocelular segundo o sistema de classificação BCLC.

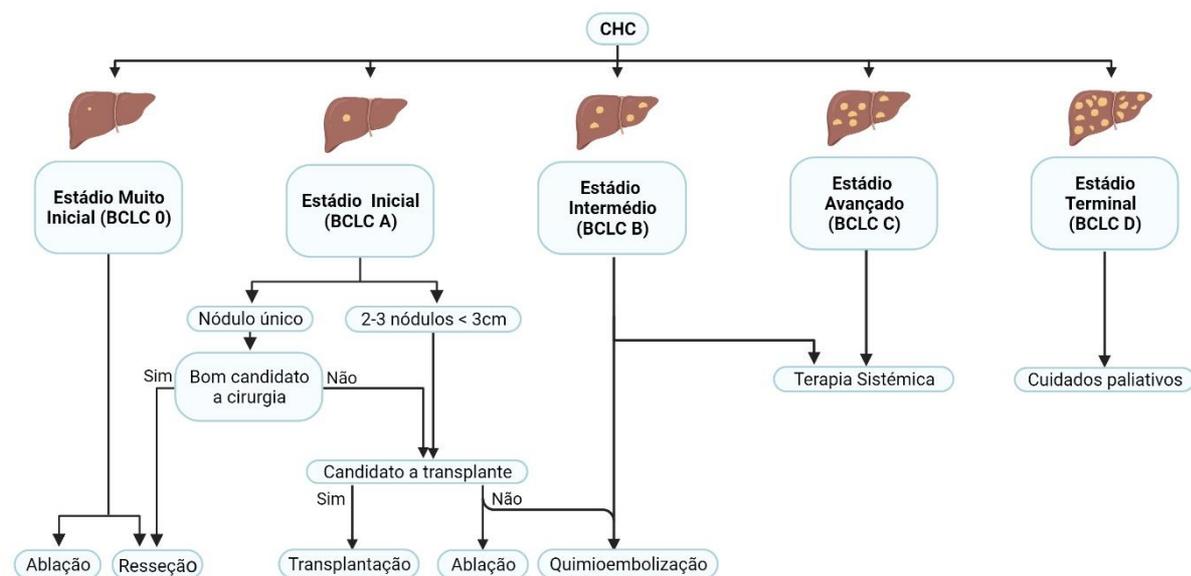


Figura 4 - Estratégias de tratamento para carcinoma hepatocelular. Segundo o BCLC, doentes assintomáticos com baixo desenvolvimento tumoral e boa função hepática (BCLC 0/A) devem ser tratados com tratamentos curativos locais tais como ressecção, ablação ou transplantação. Doentes assintomáticos com doença multinodular e função hepática não comprometida (BCLC B) devem receber quimioembolização, e a doentes BCLC C, com trombose da veia porta ou metástases, devem ser implementadas terapias sistémicas. Baseado em (Llovet et al., 2021) Criado com BioRender.com.

Embora os tratamentos atuais apresentem alguma eficácia no tratamento CHC, as taxas de recidiva ainda são muito elevadas e o prognóstico da doença continua a ser mau, principalmente nos estádios mais avançados. Desta forma, é fundamental a procura de terapias alternativas com resultados mais promissores, como por exemplo a terapia com plasma frio atmosférico.

1.3. Plasma Frio Atmosférico

1.3.1. Plasma

O plasma, conhecido como o quarto estado fundamental da matéria, é o estado físico mais abundante do nosso universo, representando mais de 99% de toda a matéria observável (Köritzer, 2014; Tabares e Junkar, 2021).

A adição de energia, sob a forma de calor ou radiação, a um sólido, leva a que este se transforme no estado líquido e, por meio de energia adicional obtém-se o gás. Se se continuar a fornecer energia ao gás, ele irá sofrer uma ionização parcial ou total, isto é, irá

ocorrer a remoção dos elétrons dos átomos ou moléculas que o constituem. Desta forma, é alcançado um novo estado de matéria, o plasma (Figura 5) (Tabares e Junkar, 2021).

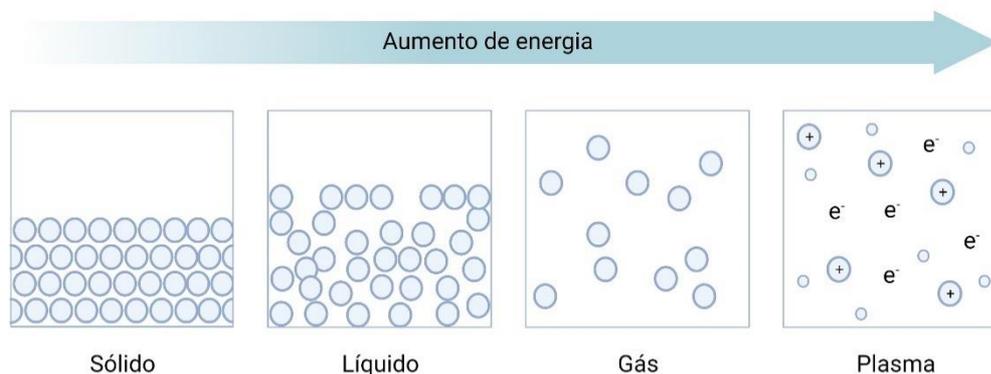


Figura 5 - Estados físicos da matéria. Representação esquemática dos quatro estados fundamentais da matéria existentes no universo: sólido, líquido, gasoso e plasma. Criado com BioRender.com.

Descrito pela primeira vez em 1879, por William Crookes, o estado de plasma é, portanto, definido como um gás parcialmente ionizado constituído por elétrons livres, átomos e moléculas (partículas eletricamente neutras) e íões (Braný *et al.*, 2020; Tabares e Junkar, 2021). No entanto, nem todos os gases ionizados que contêm partículas carregadas podem ser considerados plasma. Apenas se considera um plasma se houver neutralidade macromolecular (quase-neutralidade), ou seja, se este apresentar igual densidade de cargas positivas e negativas, tornando-se eletricamente neutro (Braný *et al.*, 2020). Para além disso, o plasma apresenta ainda propriedades que o distinguem, tais como a capacidade de conduzir corrente elétrica e de gerar campos magnéticos (Braný *et al.*, 2020; Isbary *et al.*, 2013; Kletschkus *et al.*, 2020; Tabares e Junkar, 2021).

Considerando o seu equilíbrio térmico, o plasma pode ser classificado em três tipos distintos: plasma de elevada temperatura, plasma térmico e plasma não térmico (Sakudo, Yagyu e Onodera, 2019; Tabares e Junkar, 2021).

O plasma de elevadas temperaturas encontra-se em equilíbrio térmico, ou seja, todas as partículas constituintes do plasma, nomeadamente os elétrons, íões e partículas neutras, estão à mesma temperatura. Este tipo de plasma, também denominado de plasma quente, é caracterizado por temperaturas muito elevadas na ordem dos 10^8 °C e pode ser encontrado no núcleo solar (Braný *et al.*, 2020; Tabares e Junkar, 2021).

Similar ao anterior, o plasma térmico é também uma forma de plasma fortemente ou totalmente ionizado, no qual as partículas estão em equilíbrio térmico (Tabares e Junkar,

2021). No entanto, este último caracteriza-se por temperaturas inferiores, de 2×10^4 °C, e pode ser observável em fenómenos naturais tais como os relâmpagos (Braný *et al.*, 2020).

Contrariamente aos anteriores, no plasma não térmico, os eletrões encontram-se a temperaturas muito mais elevadas que as restantes partículas pesadas do gás (partículas neutras e iões) (Babington *et al.*, 2015; Tabares e Junkar, 2021). Também conhecido por plasma frio, este plasma é um gás parcialmente ionizado com temperatura aproximadamente igual à ambiente que pode ser gerado artificialmente a baixas pressões ou mesmo a pressão atmosférica (Sakudo, Yagyu e Onodera, 2019). Este último é designado por plasma frio atmosférico (PFA) ou CAP (do inglês *Cold Atmospheric Plasma*), e tem sido foco de investigação na medicina, visto que as espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (RONS, do inglês *reactive oxygen and nitrogen species*), os campos elétricos, e a radiação ultravioleta (UV) por ele geradas, parecem ter um papel crucial no tratamento de tecidos biológicos (Braný *et al.*, 2020; Busco *et al.*, 2020; Sakudo, Yagyu e Onodera, 2019; Šimončicová *et al.*, 2019; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

1.3.2. Produção de plasma

Para que ocorra a produção de plasma é necessário fornecer energia a um gás, induzindo a sua ionização parcial. Esta energia, que pode ser obtida através de calor, durante um processo de combustão, ou através da aplicação de uma descarga elétrica num gás, irá promover a dissociação dos eletrões dos átomos. A interação dos eletrões e dos átomos ionizados com as restantes partículas do gás desencadeia uma reação em cascata, cujo produto final é o plasma (Busco *et al.*, 2020; Privat-Maldonado *et al.*, 2019; Tabares e Junkar, 2021).

Atualmente, os dispositivos de produção de plasma frio atmosférico, experimentalmente testados e usados na clínica, podem ser classificados em três grupos, de acordo com a sua forma de aplicação: diretos, indiretos ou híbridos (Braný *et al.*, 2020; Körtzer, 2014).

Nas fontes de plasma direto, a amostra a ser tratada (células, tecidos) pode atuar como um dos elétrodos envolvidos na descarga, de maneira que a corrente produzida passa pela área-alvo, não sendo necessariamente uma limitação (Malyavko *et al.*, 2020). Para além disso, também o contacto direto entre o plasma e a amostra permite gerar plasmas densos com elevadas concentrações de espécies reativas (Isbary *et al.*, 2013). Um exemplo muito comum de dispositivo de produção de plasma direto é a descarga de barreira dielétrica (DBD, do inglês *dielectric barrier discharge*). Estruturalmente, este tipo de dispositivos exhibe dois

elétrodos metálicos, um conectado a uma fonte de alimentação de alta tensão e outro ligado à terra (*grounded electrode*) sendo que pelo menos um deles é revestido por um material dielétrico, responsável por reduzir a corrente que passa para a área-alvo. Quando aplicada uma corrente de elevada voltagem, o gás contido entre os dois eletrodos sofre ionização e gera um plasma não térmico, eletricamente seguro, mesmo acima da amostra (Babington *et al.*, 2015; Isbary *et al.*, 2013; Kaushik *et al.*, 2019).

Para aplicações *in vivo*, com potencial aplicação médica, Fridman propôs uma adaptação do dispositivo anterior, à qual denominou de descarga de barreira dielétrica de eletrodo flutuante (FE-DBD, do inglês *floating electrode dielectric barrier discharge*) (Dobrynin *et al.*, 2009; Fridman *et al.*, 2008). Nesta variação de DBD, um dos eletrodos é revestido por quartzo, sendo que a área-alvo (tecido humano, entre outros) funciona como o eletrodo terra. Devido à elevada capacidade de armazenamento de carga do quartzo, é possível fazer o tratamento do tecido vivo com segurança (Figura 6) (Isbary *et al.*, 2013). Também o contacto direto entre o plasma e a amostra é uma mais-valia deste tipo de dispositivos, na medida em que várias espécies, nomeadamente partículas carregadas, fótons UV e espécies reativas, fundamentais no tratamento, atingem a área alvo. A área de descarga é, contudo, limitada, uma vez que tem que estar entre os dois eletrodos e a uma distância relativamente constante (Braný *et al.*, 2020; Isbary *et al.*, 2013).

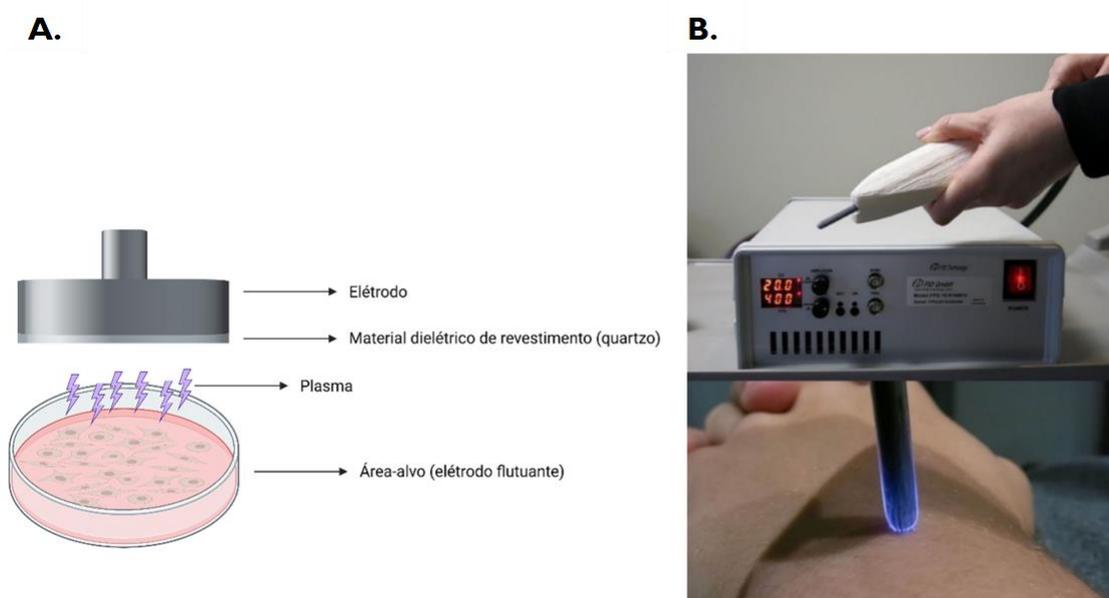


Figura 6 - Descarga de barreira dielétrica de eletrodo flutuante (FE-DBD). **A.** Representação esquemática do dispositivo de descarga direta de plasma, FE-DBD. **B.** Exemplo real de dispositivo de FE-DBD. O eletrodo conectado à fonte de alimentação deve ser mantido a uma distância constante da amostra de modo a ocorrer a formação de plasma, não excedendo 1 mm. Adaptado de (Fridman, 2020). Criado com BioRender.com.

Contrariamente aos dispositivos de descarga direta, nos dispositivos de descarga indireta, a amostra não é parte ativa no processo de formação do plasma (Isbary *et al.*, 2013). Nestes dispositivos, o plasma é gerado entre dois elétrodos e, posteriormente, é transportado para a área-alvo, por difusão ou por gases nobres, como o hélio (He) ou o árgon (Ar). O uso de um gás transportador permite assim um maior controlo da composição do plasma, na medida em que é possível modificar a sua composição de espécies reativas para situações clínicas específicas (Isbary *et al.*, 2013). No entanto, este tipo de dispositivos apresenta algumas limitações como o baixo controlo do plasma e a baixa produção de espécies reativas, comparativamente aos dispositivos DBD. Para além disso, as espécies de curta vida geradas no plasma, como átomos e radicais livres, podem mesmo ser consumidas antes de atingir a superfície da área alvo, devido a reações de fase gasosa (Braný *et al.*, 2020; Helmke, Gerling e Weltmann, 2018; Isbary *et al.*, 2013; Malyavko *et al.*, 2020). As fontes de plasma indireto apresentam uma grande variedade de configurações devido ao tamanho, tipo de gás e energia que operam, podendo ir de dispositivos estreitos como jatos de plasma (Figura 7), também denominados de agulhas de plasma (*plasma needles*), até dispositivos maiores como as tochas de plasma (*plasma torches*) (Keidar, 2020).

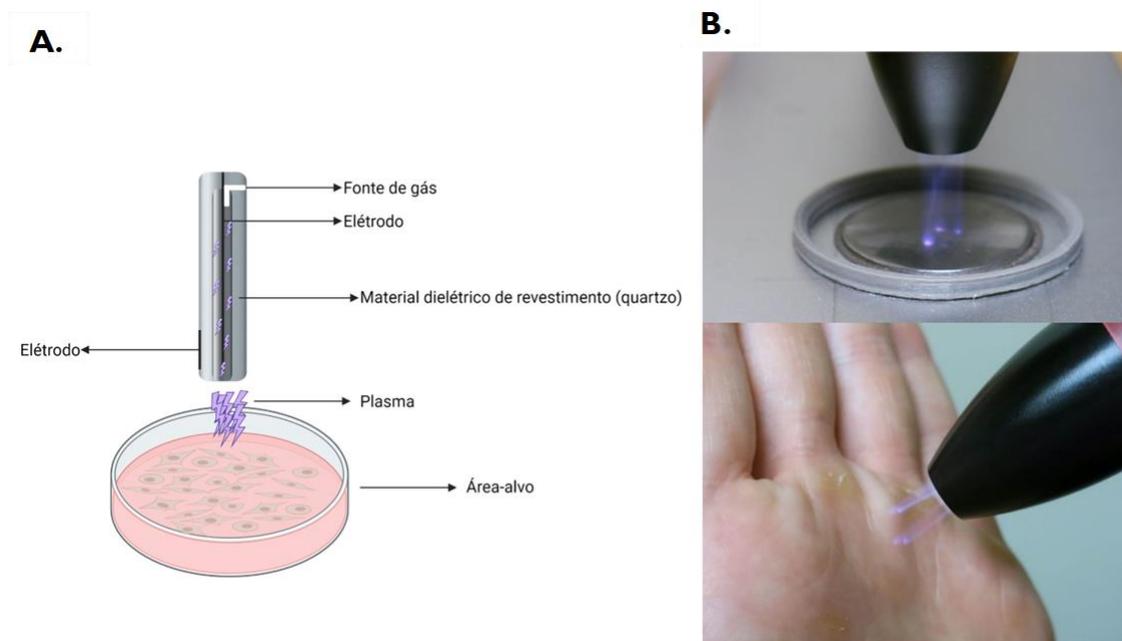


Figura 7 - Jato de plasma. **A.** Representação esquemática do dispositivo de descarga indireta de plasma. **B.** Exemplo real de dispositivo de um plasma Jet utilizando o hélio como gás transportador. Neste dispositivo em específico, o plasma é gerado por um elétrodo retangular dentro de um dispositivo e é posteriormente transportado até à área-alvo. Adaptado de (Friedman, 2020) e (Metelmann, Woedtke, von e Weltmann, 2018). Criado com BioRender.com.

Por sua vez, os dispositivos de produção de plasmas híbridos surgem de uma combinação de princípios de produção dos dispositivos acima mencionados, na medida em que possuem a técnica de produção das fontes de plasma direto, e a ausência de corrente, característica das fontes de plasma indireto (Isbary *et al.*, 2013). Nestes dispositivos é criada uma descarga uniforme de plasma, por micro descargas, num eletrodo ligado à terra, revestido por uma malha metálica (*grounded wire mesh electrode*). Esta malha metálica apresenta uma resistência elétrica significativamente menor que a amostra, de maneira que a corrente gerada não passa através da área alvo situada entre os dois eletrodos (Braný *et al.*, 2020; Gay-Mimbrera *et al.*, 2016; Isbary *et al.*, 2013). Estes dispositivos, atualmente de aplicação unicamente experimental, são relativamente fáceis de controlar, contudo são bastante suscetíveis a deterioração (Braný *et al.*, 2020). Um exemplo muito comum de dispositivos de produção de plasmas híbridos é o FlatPlaSter 2.0 que se baseia na tecnologia de micro descarga de superfície (SMD, do inglês *surface micro discharge*) através da qual produz um plasma homogêneo a partir do ar (Isbary *et al.*, 2013).

1.3.3. Aplicações biomédicas

O plasma frio atmosférico (PFA) tem-se tornado, ao longo dos anos, numa tecnologia médica bastante promissora, com várias aplicações nos campos da medicina. O PFA apresenta propriedades específicas, tais como a baixa temperatura e a quasi-neutralidade, que lhe permitem uma aplicação segura na interação com superfícies inorgânicas e sistemas biológicos delicados (Duarte e Panariello, 2020). O tratamento de infecções relacionadas com biofilmes, tratamentos de feridas e doenças de pele, tratamento de infecções virais, tratamento do cancro e otimização de implantes são algumas das várias aplicações do plasma frio atmosférico, até então estudadas (Bernhardt *et al.*, 2019; Duarte e Panariello, 2020). A Figura 8 ilustra essas aplicações.

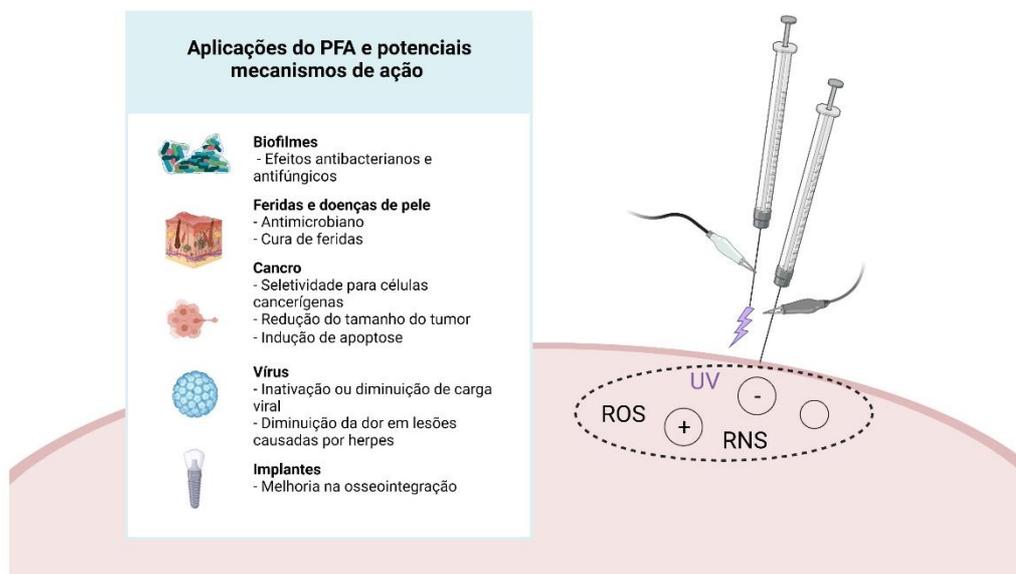


Figura 8 - Aplicações do plasma frio atmosférico e potenciais mecanismos do plasma. Aquando da interação do plasma com uma superfície viva, há a produção de radiação ultravioleta (UV), cargas positivas e negativas, partículas neutras e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS). Estes eventos permitem uma aplicação do plasma no tratamento de doenças de pele, inativação de vírus e bactérias, tratamento do cancro e otimização de implantes. Adaptado de (Duarte e Panariello, 2020). Criado com BioRender.com.

Vários estudos têm demonstrado a eficácia do plasma frio atmosférico em eliminar vários agentes patogénicos e os seus biofilmes. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* demonstraram uma redução significativa da população, tanto na forma planctónica como na forma de biofilme, após exposição ao tratamento (Ziuzina *et al.*, 2015). Também a aplicação do PFA em fungos como a *Candida albicans*, muitas vezes responsáveis por infeções orais, tem levado a uma maior diminuição das colónias formadas comparativamente a desinfetantes químicos já aprovados (Koban *et al.*, 2010). Desde então, o uso do plasma para limpeza e desinfecção de material cirúrgico, bem como de superfícies, tem ganho interesse acrescido (Duarte e Panariello, 2020).

Uma outra aplicação do PFA foca-se no tratamento de feridas e doenças de pele. Evidências demonstram que o seu potencial antimicrobiano é crucial no tratamento de feridas, devido à remoção dos microrganismos causadores da infeção. Por outro lado, tem-se verificado que o tratamento com plasma frio atmosférico induz uma maior produção de fibroblastos e de colagénio, fundamentais ao processo de cura e cicatrização de feridas. Também a produção de fatores de crescimento tais como o TGF- β 1 (do inglês *transforming growth factor beta 1*) e TGF- β 2 (do inglês *transforming growth factor beta 2*) e interleucina 8 (IL-

8), após o tratamento, parece contribuir para o processo curativo (Arndt *et al.*, 2015; Bernhardt *et al.*, 2019; Duarte e Panariello, 2020; Izadjoo *et al.*, 2018).

Para além das aplicações discutidas anteriormente, o PFA tem sido alvo de estudo na inativação de vírus, tais como o da influenza A e B e o vírus sincicial respiratório (RSV, do inglês *respiratory syncytial virus*) (Filipić *et al.*, 2020; Sakudo *et al.*, 2017). Tem-se verificado que o elevado potencial oxidativo do plasma pode levar a uma interrupção da integridade dos vírus, quer a nível estrutural quer genómico, afetando tanto proteínas como ácidos nucleicos. Alterações conformacionais nas proteínas da cápside causadas pelas espécies reativas, produzidas durante o tratamento, podem resultar numa diminuição da infectividade dos vírus, devido à fraca ligação deste com os recetores de superfície das células hospedeiras (Filipić *et al.*, 2020). Adicionalmente, o plasma frio atmosférico tem demonstrado efeitos benéficos na diminuição da dor em doentes infetados com herpes zóster (Isbary *et al.*, 2014).

Como aplicação médica complementar, o plasma pode também ser usado para modificar superfícies. Esta aplicação, fortemente utilizada na indústria, permite criar e otimizar superfícies biorrelevantes para aumentar a biocompatibilidade e a biofuncionalidade de dispositivos médicos (Duarte e Panariello, 2020). Nos implantes, por exemplo, o plasma tem demonstrado efeitos benéficos na osteointegração, uma vez que ao modificar a química elementar da superfície, permite uma maior formação óssea e fixação biomecânica do implante naquele local (Coelho *et al.*, 2012; Danna *et al.*, 2015; Giro *et al.*, 2013).

Mais recentemente, o plasma frio atmosférico tem sido visto como um potencial tratamento para neoplasias malignas (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Duarte e Panariello, 2020; Silva-Teixeira *et al.*, 2021). Através da entrega das RONS diretamente nos tecidos, este tem demonstrado ser uma terapia inovadora para o tratamento do cancro. Para além disso, tem demonstrado ser seletivo para as células neoplásicas e ser capaz de diminuir o tamanho do tumor (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Duarte e Panariello, 2020; Keidar *et al.*, 2011; Silva-Teixeira *et al.*, 2021; Tavares-da-Silva *et al.*, 2021).

1.3.4. Aplicações em Oncologia

Vários avanços têm sido feitos no tratamento do cancro ao longo das últimas décadas. No entanto, as terapias atualmente implementadas ainda carecem de eficácia uma vez que estão associadas a falta de seletividade para as células malignas, induzindo danos celulares noutras células do organismo. A dificuldade na remoção de tumores devido ao seu tamanho

e localização, ou os efeitos adversos provenientes da radiação são também algumas desvantagens associadas a estas terapias (Gyanani, Haley e Goswami, 2021).

Por este motivo, existe ainda a necessidade de desenvolver novas estratégias de maneira a contornar estes problemas.

No que diz respeito ao PFA, este tem-se mostrado uma opção terapêutica bastante promissora para o tratamento de tumores, devido à sua capacidade seletiva para induzir a morte de células cancerígenas. Ainda assim, os mecanismos subjacentes ao tratamento estão pouco esclarecidos, uma vez que a composição do PFA leva a uma interação complexa com os sistemas biológicos (Semmler *et al.*, 2020; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

Quanto à aplicação desta terapia, existem duas estratégias desenvolvidas ao longo da última década: aplicação direta e aplicação indireta (Figura 9) (Yan, Sherman e Keidar, 2017).

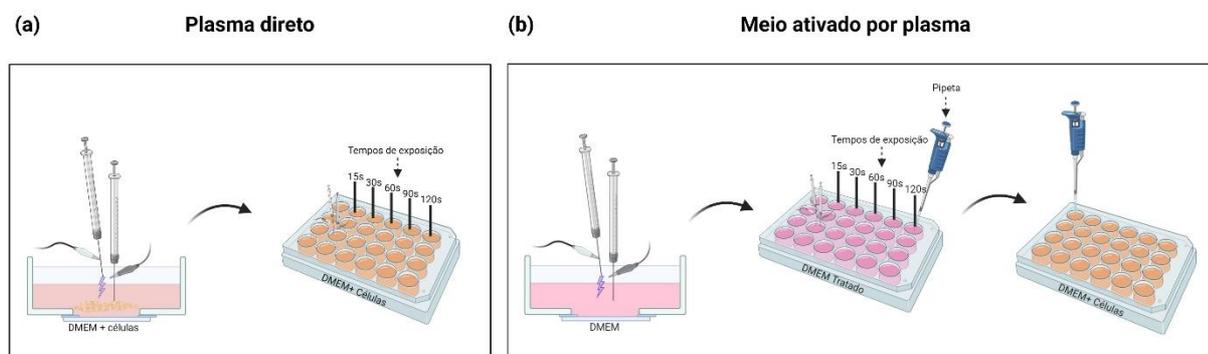


Figura 9 - Ilustração de duas estratégias distintas de aplicação do plasma frio atmosférico. (a) Aplicação direta do PFA. **(b)** Aplicação indireta de PFA usando soluções ativadas por plasma, como por exemplo meio de cultura celular. Adaptado de (Malyavko *et al.*, 2020). Criado com BioRender.com.

A primeira consiste na aplicação direta do plasma com o objetivo de tratar células semeadas numa placa de cultura celular ou placa de Petri. Nesta abordagem, as células cultivadas estão cobertas por uma camada fina de meio e, pelo menos, três fatores relacionados com o plasma podem ter impacto nestas: espécies reativas de curta-vida (O_2^- e OH^\bullet), espécies reativas de longa-vida (H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- e $ONOO^-$) e fatores físicos (radiação UV, calor e campos eletromagnéticos) (Malyavko *et al.*, 2020; Yan, Sherman e Keidar, 2017). Contrariamente à aplicação direta, a aplicação indireta de plasma, das quais as soluções ativadas por plasma (PAS, do inglês *plasma-activated solutions*) são exemplo, consiste na irradiação de uma solução aquosa, seja essa solução meio de cultura ou outra, que posteriormente é transposta para uma placa com células em cultura. Nesta abordagem, apenas as espécies de longa-vida devem ser consideradas (Malyavko *et al.*, 2020; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

De um modo geral, quando o plasma atinge as células, no caso de aplicação direta, ocorre um processo quase instantâneo de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) (Keidar, 2020). Posteriormente, estas espécies dissolvem-se no meio de cultura e difundem-se para dentro das células, desencadeando uma série de eventos que podem levar à sua morte, tais como a sobrecarga do sistema antioxidante. Assim, um aumento da concentração intracelular de RONS causa vários danos em componentes celulares importantes tais como a membrana celular, o DNA, a mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE), desencadeando apoptose, necrose, autofagia ou, até mesmo, senescência (Keidar, 2020; Malyavko *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2015).

Apesar destas abordagens terem fundamentos diferentes e conseqüentemente aplicações diferentes, apresentam algumas semelhanças, uma vez que os danos celulares causados pelos tratamentos, bem como a sensibilidade das células aos mesmos aparentam ser similares (Semmler *et al.*, 2020). Ainda assim, existem algumas diferenças entre estes tipos distintos de tratamento, das quais é exemplo a ativação celular (Malyavko *et al.*, 2020). A ativação, resultante do tratamento direto com PFA, resulta numa maior sensibilidade das células cancerígenas à ação das espécies radicalares, principalmente o H_2O_2 e o NO_2^- (Malyavko *et al.*, 2020). No entanto, os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente conhecidos. Estudos têm vindo a demonstrar que as espécies reativas de longa vida, das quais o H_2O_2 e NO_2^- são exemplo, não são suficientes para induzir o estado de ativação nas células. Para além disso, a inibição de espécies radicalares com recurso a agentes antioxidantes, não se tem mostrado um obstáculo à entrada das células neste estado (Yan *et al.*, 2020). Com base nestes resultados, pensa-se que a ativação das células tumorais ocorra principalmente devido aos fatores físicos do plasma. Como as células submetidas ao tratamento indireto não são influenciadas por estes fatores, a ativação não ocorre nestas células (Malyavko *et al.*, 2020; Tornin *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2020).

1.3.5. Seletividade do PFA para células malignas

Contrariamente às terapias convencionais anteriormente referidas, o PFA possui uma potencial seletividade para células malignas, poupando assim as células saudáveis de danos celulares (Yan, Sherman e Keidar, 2017). Esta propriedade do tratamento foi descrita pela primeira vez em melanoma e no cancro colo retal e, desde então, tem-se tornado uma das principais propriedades que torna o PFA um tratamento tão promissor (Georgescu e Lupu,

2010; Zirnheld *et al.*, 2010). No entanto, a compreensão do mecanismo por detrás deste efeito anticancerígeno seletivo ainda permanece um desafio para a comunidade científica. Vários estudos demonstram que fatores como o tipo de células e, conseqüentemente, de cancro e as condições nas quais estas células são cultivadas, bem como a fonte de plasma e a sua composição, influenciam fortemente o tratamento com PFA (Biscop *et al.*, 2019; Semmler *et al.*, 2020). Para além disso, acredita-se que as diferenças entre células malignas e células saudáveis sejam o fator determinante para a seletividade da terapia (Yan *et al.*, 2015).

Geralmente, as células tumorais tendem a ser mais sensíveis a estímulos oxidativos exógenos comparativamente às células normais, o que pode ser explicado pela maior concentração de ROS intracelulares existente nestas células (Semmler *et al.*, 2020). As ROS desempenham um papel chave na regulação de processos biológicos que promovem o crescimento e a proliferação celulares. No entanto, níveis elevados destas espécies reativas podem ser prejudiciais para as células levando mesmo à sua morte (Aggarwal *et al.*, 2019). Sob condições fisiológicas, as células normais mantêm uma homeóstase *redox* com baixos níveis de ROS basais, através do balanço entre a formação destas espécies (capacidade pró-oxidante) e a sua eliminação (capacidade antioxidante). Desta forma, conseguem tolerar um certo stresse causado por ROS exógenas (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009). Em casos de patologia como o cancro, as células tumorais apresentam um nível de ROS basal muito maior que as células normais, devido às alterações metabólicas presentes (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009; Yan, Sherman e Keidar, 2017). Para além disso, o sistema antioxidante destas células, essencial para manter o equilíbrio *redox*, encontra-se também mais enfraquecido, tornando-as mais sensíveis ao stresse oxidativo. Assim, um aumento de ROS nas células cancerígenas, causado pelo tratamento com PFA, pode fazer com que estas células ultrapassem o seu limiar de sobrevivência, levando a danos e a morte celular (Figura 10) (Braný *et al.*, 2020; Semmler *et al.*, 2020; Trachootham, Alexandre e Huang, 2009; Yan, Sherman e Keidar, 2017).

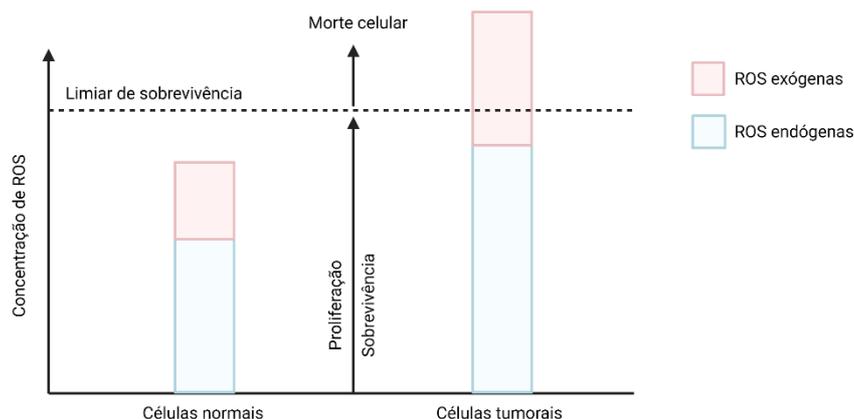


Figura 10 - Diferença de concentrações de RONS nas células normais e tumorais como princípio biológico para a seletividade dos tratamentos. Contrariamente às células normais, que possuem níveis de ROS basais baixos, as células tumorais apresentam níveis muito superiores destas espécies devido ao seu forte metabolismo e sistema antioxidante enfraquecido. Desta forma, quando é causado stresse nestas células devido a um aumento de ROS exógenas, estas podem ultrapassar um ponto de não retorno que leva à sua morte. Adaptado de (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009; Yan *et al.*, 2015). Criado com BioRender.com.

Contudo, o notável aumento de ROS ocorre especificamente em células cancerígenas, o que pode ser explicado pela expressão de aquaporinas e da quantidade de colesterol presente na membrana citoplasmática destas células (Braný *et al.*, 2020; Semmler *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2015).

As espécies reativas geradas pelo PFA são moléculas polares ou com carga e, por isso, para ocorrer a sua difusão através da membrana celular necessitam do auxílio de transportadores ou canais específicos tais como as aquaporinas (AQPs) (Yan *et al.*, 2015). As aquaporinas foram identificadas pela primeira vez como canais de água. No entanto, tem-se vindo a demonstrar que estes canais facilitam o transporte passivo de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio, podendo também facilitar a passagem de moléculas mais pequenas. Uma vez que as células tumorais expressam mais AQPs que as células normais, o transporte de ROS e de RNS, através da membrana destas células ocorre mais facilmente (Figura 11) (Semmler *et al.*, 2020).

Para além da expressão das aquaporinas, a difusão destes radicais livres é altamente influenciada pela estrutura lipídica da membrana, mais precisamente pela quantidade de colesterol presente nela. O colesterol é o principal constituinte das membranas das células animais, tendo como função a manutenção da estabilidade e fluidez da membrana (Meyer e Smit, 2009; Semmler *et al.*, 2020). Quando esta estabilidade é afetada, devido a peroxidação lipídica por radicais livres, na qual ocorre a transferência de um eletrão de um lípido para um

radical livre, podem formar-se poros na membrana que facilitam a difusão das espécies reativas para dentro da célula. Relativamente às células normais, estas apresentam elevadas quantidades de colesterol na membrana e como tal, a condensação dos lípidos nestas células fornece uma barreira à passagem das ROS. No caso das células cancerígenas, a quantidade deste lípido é relativamente menor, tornando-as mais suscetíveis à peroxidação lipídica. Desta forma, a difusão das espécies reativas ocorre mais facilmente nestas células (Paal, Van der et al., 2016; Ratovitski et al., 2014; Semmler et al., 2020).

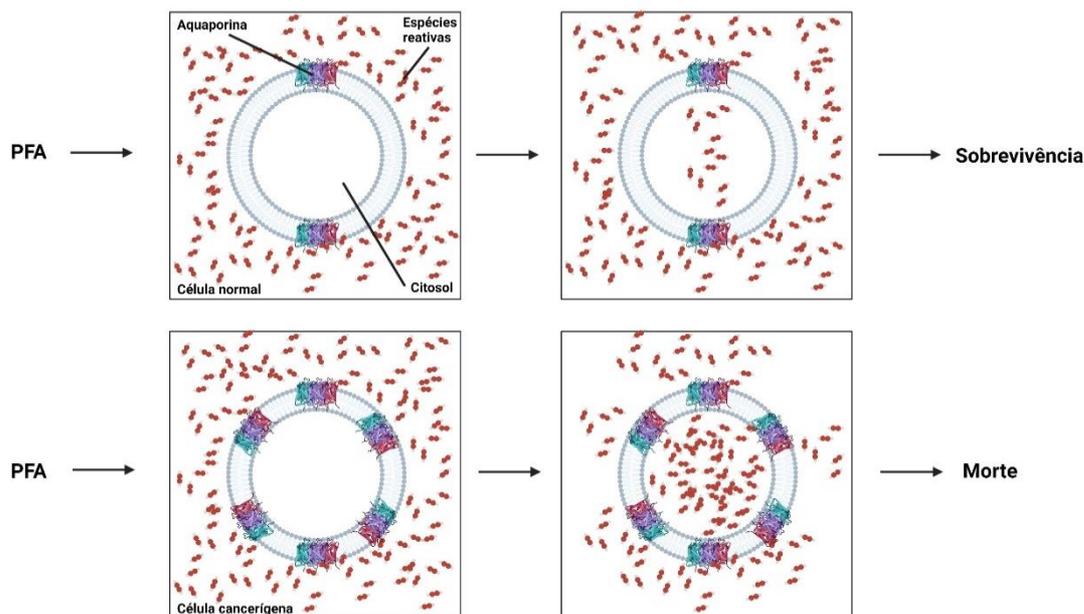


Figura 11 - Diferente expressão de aquaporinas na membrana plasmática de células normais e tumorais como princípio biológico para a seletividade dos tratamentos. As células cancerígenas expressam um maior número de aquaporinas na membrana plasmática, facilitando assim a difusão de espécies reativas para dentro da célula. A elevada concentração de espécies reativas dentro da célula leva à sua morte. Adaptado de (Yan et al., 2015). Criado com BioRender.com.

1.3.6. Mecanismos de ação do plasma frio atmosférico

Como referido anteriormente, a constituição do plasma não se resume às RONS. Outros fatores físicos, tais como o calor, a radiação ultravioleta e os campos eletromagnéticos gerados durante o tratamento também devem ser considerados (Semmler et al., 2020; Yan, Sherman e Keidar, 2017). Quanto ao calor, estudos têm demonstrado que durante o tratamento direto com PFA, há um ligeiro aumento da temperatura do meio (Yan, Sherman e Keidar, 2017). Ainda assim, não parece ser o suficiente para a inibição do crescimento destas células. Adicionalmente, a radiação UV e os campos eletromagnéticos gerados, também não parecem ser fatores significativos na indução de danos celulares. Por este motivo, e pela

evidência de semelhança de efeitos no tratamento direto e indireto, acredita-se que o componente mais importante do plasma sejam as RONS (Semmler *et al.*, 2020). Também a eliminação destas espécies, com recurso a agentes antioxidantes tais como a cisteína ou catalase, tem demonstrado perda da citotoxicidade do tratamento (Malyavko *et al.*, 2020).

Uma vez dentro das células, as RONS podem interagir com diferentes moléculas e influenciar vários processos celulares. Destas moléculas, assume especial importância o cálcio, um segundo mensageiro, presente no lúmen do retículo endoplasmático (Görlach *et al.*, 2015; Semmler *et al.*, 2020). O retículo endoplasmático é um organelo constituído por chaperonas moleculares, enzimas, elevadas concentrações de ATP e de cálcio, que tem como principal função o correto enrolamento e maturação das proteínas. Para além disso, é também o principal depósito de cálcio intracelular (Zeeshan *et al.*, 2016). Assim, quando ocorrem perturbações neste organelo, o designado stresse do retículo endoplasmático, desencadeiam-se várias reações com o objetivo de reestabelecer a homeóstase, que em exagero podem ser fatais para as células. Essas perturbações estão muitas vezes associadas com uma diminuição do cálcio no lúmen, provocada pelo aumento de ROS induzido pelo tratamento com PFA. Esta perda de cálcio, durante o stresse do RE, é mediada por transportadores sensíveis às ROS, que permitem a sua libertação para o citosol, os recetores rianodina (RYR, do inglês *ryanodine receptor*) e do inositol trifosfato (IP3R, do inglês *inositol trisphosphate receptor*) (Deniaud *et al.*, 2008; Görlach *et al.*, 2015).

O aumento de cálcio no citoplasma, provocado pelo stresse do retículo, pode ser também prejudicial para a mitocôndria (Semmler *et al.*, 2020). Embora o retículo e a mitocôndria tenham funções distintas, estes organelos estão fisiologicamente interligados pelas designadas membranas do retículo endoplasmático associadas à mitocôndria (MAMs, do inglês *mitochondria-associated endoplasmatic reticulum membranes*) (Naon e Scorrano, 2014). Desta forma, o stresse no retículo endoplasmático leva a um influxo exagerado de cálcio para a mitocôndria que pode dar origem à ativação da apoptose via citocromo c. A oxidação da mitocôndria e a despolarização da sua membrana, bem como a indução da apoptose, têm sido demonstrados após o tratamento com PFA (Raturi e Simmen, 2013; Semmler *et al.*, 2020).

Relativamente às RNS, o conhecimento científico acerca destas espécies ainda é muito limitado. Dados indicam que estas espécies têm uma maior permeação relativamente às ROS e, por esse motivo, a sua entrada pode levar à indução da apoptose mitocondrial através da interrupção da função do citocromo c (Semmler *et al.*, 2020). O óxido nítrico, por exemplo, exerce efeitos citotóxicos nos tecidos e, embora os mecanismos subjacentes a esse mecanismo ainda não estejam totalmente esclarecidos, é sabido que a ligação deste composto

à citocromo oxidase, enzima terminal da cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria, leva a um aumento de ROS intracelulares induzindo a apoptose (Moncada e Erusalimsky, 2002; Semmler *et al.*, 2020).

Para além da sua interação com a via de sinalização do cálcio, as RONS, em concentrações elevadas, são também responsáveis por outras respostas celulares, nomeadamente lesões no DNA (Semmler *et al.*, 2020). Entre estas lesões encontram-se quebras na cadeia simples e na cadeia dupla de DNA (DSB, do inglês *double strand breaks*), danos oxidativos e também ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína (Han *et al.*, 2014; Ptasíńska *et al.*, 2010). Os danos no DNA, como consequência do tratamento com PFA, têm sido demonstrados em vários estudos. No entanto, sabe-se também que a quebra da dupla cadeia, por exemplo, está dependente da distância entre a fonte de plasma e as células, e do tempo de administração do tratamento (Han *et al.*, 2013).

A paragem do ciclo celular em diversas fases, associada a DSB e consequentemente apoptose, também foi demonstrada em alguns cancros tais como o glioblastoma e o cancro colo retal (Vandamme *et al.*, 2012). É sabido que a ataxia-telangiectasia mutada (ATM, do inglês *ataxia telangiectasia mutated*), cinase recrutada durante as DSBs, é responsável pela fosforilação de proteínas tais como a H2AX, P53 e P73 que fazem a verificação dos danos, levando à paragem do ciclo celular, reparação do DNA ou apoptose. Estas quebras da cadeia podem não ser resultantes da aplicação direta do PFA, mas sim resultante da apoptose induzida por este (Semmler *et al.*, 2020).

Um outro aspeto relevante no tratamento com PFA, é o sistema antioxidante das células (Semmler *et al.*, 2020). Este sistema, constituído por antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos, tem um papel fundamental na vida das células na medida em que lhes permite combater o stresse oxidativo causado pelas espécies reativas geradas durante o tratamento (Glasauer e Chandel, 2014).

No que diz respeito às defesas antioxidantes, sabe-se que estas possuem a capacidade de proteger as células de danos oxidativos uma vez que são capazes de decompor as espécies reativas. Entre estas, destacam-se a superóxido dismutase, capaz de degradar o anião superóxido, e a catalase e as glutatonas peroxidases, responsáveis pela decomposição do peróxido de hidrogénio (Semmler *et al.*, 2020). Apesar da célula possuir todo este sistema que a protege contra o stresse oxidativo, a sobrecarga do mesmo, devido às espécies reativas geradas pelo tratamento, torna limitada a atividade dos intervenientes e pode levar à indução de morte celular (Glasauer e Chandel, 2014).

Como consequência adicional do PFA, as células tendem a perder também a sua adesão, migração e invasão (Semmler *et al.*, 2020). Vários estudos têm vindo a demonstrar que, após o tratamento, as células expressam menos integrinas, moléculas de adesão que desempenham um papel essencial nos processos acima referidos. Embora o mecanismo por trás desta baixa expressão de integrinas na membrana ainda não esteja totalmente elucidado, acredita-se que a inibição destas moléculas possa ser relevante para a eficácia do tratamento com PFA, uma vez que estas têm um papel crucial nos processos de transformação maligna, de inibição de apoptose e da metastização (Filla *et al.*, 2017; Semmler *et al.*, 2020).

No que respeita ao tipo de morte desencadeada pelo tratamento, ainda existe alguma controvérsia. Estudos têm vindo a reportar a apoptose e a necrose como os eventos mais frequentes (Dai *et al.*, 2020; Semmler *et al.*, 2020). No entanto, sabe-se também que tratamento com PFA pode induzir senescência e autofagia nas células tumorais (Arndt *et al.*, 2013; Hirst *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2018; Semmler *et al.*, 2020). Qualquer um destes tipos de morte parece estar relacionado com o tempo de exposição ao tratamento (Semmler *et al.*, 2020). A senescência, paragem do crescimento celular em resposta ao stresse, pode ser induzida, após curtos tempos de exposição ao PFA. Por outro lado, a apoptose e a necrose apenas são desencadeadas após maiores tempos de exposição (Semmler *et al.*, 2020).

No que diz respeito à autofagia, processo crucial na homeóstase celular por meio da degradação dos componentes citoplasmáticos, foi recentemente relatada em estudos com PFA (Yoshikawa *et al.*, 2020). Hirst *et al.* demonstraram que em culturas primárias de células epiteliais normais e tumorais da próstata, o tratamento com PFA para além de induzir necrose induzia também autofagia. Estes resultados foram mais evidentes nas culturas primárias de células normais da próstata, o que o autores justificaram com a hipótese de estas serem mais tolerantes ao aumento de espécies reativas e, desta forma, utilizarem este processo como forma de sobrevivência (Hirst *et al.*, 2015).

A figura 12 sumariza os mecanismos moleculares subjacentes à eficácia do tratamento com plasma frio atmosférico.

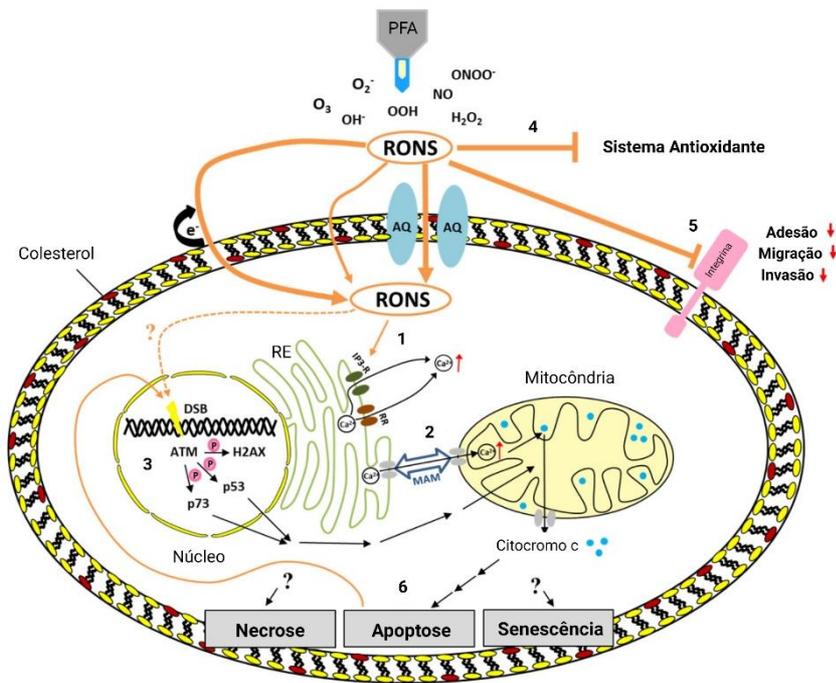


Figura 12 - Mecanismos moleculares responsáveis pela eficácia do tratamento com PFA. 1- O aumento das RONS intracelulares tem interferência na via de sinalização do cálcio, resultando num influxo deste para o citosol. 2- Para além disso, as RONS induzem stress no retículo endoplasmático levando a um influxo de cálcio para dentro da mitocôndria. Isto leva a uma diminuição do potencial de membrana que pode resultar na indução da apoptose dependente da mitocôndria. 3- O PFA induz quebras na dupla cadeia de DNA levando à ativação de ATM, H2AX, P53 e P73. 4- O aumento dos níveis de RONS leva também a uma sobrecarga do sistema antioxidante limitando a sua capacidade de combater o stress oxidativo. 5- A reduzida expressão de integrinas na membrana plasmática, após tratamento com PFA, pode explicar a diminuição da adesão, migração e invasão das células tumorais. 6- Como consequência do tratamento com PFA, as células podem sofrer necrose, apoptose e senescência. No entanto, os mecanismos pelos quais isto acontece ainda precisam ser elucidados. Adaptado de (Semmler et al., 2020). Criado com BioRender.com.

I.3.7.PFA e indução de resposta imune

Dado que o plasma frio atmosférico é uma terapia local, possivelmente moduladora do microambiente tumoral, vários estudos têm levantado a hipótese deste ser capaz de estimular o sistema imunitário. Por um lado, acredita-se que tem a capacidade de afetar diretamente as células imunes, levando à sua ativação ou ao recrutamento de subpopulações específicas. Por outro, pensa-se que o PFA possa levar a uma ativação indireta de células imunitárias devido à indução de morte celular imunogénica (ICD, do inglês *immunogenic cell death*) nas células cancerígenas e a sinais pró-inflamatórios presentes no microambiente tumoral (Bekeschus, Clemen e Metelmann, 2018; Khalili et al., 2019; Semmler et al., 2020).

Relativamente à primeira hipótese, estudos têm vindo a demonstrar alterações tanto nos níveis de células imunitárias inatas como nos níveis de células imunitárias adaptativas. Os

macrófagos, principais responsáveis pela resposta imunitária inata, apresentam uma maior atividade migratória, maior liberação de citocinas e maior toxicidade anti tumoral após tratamento com PFA (Miller *et al.*, 2014). Por sua vez, os neutrófilos, após o tratamento, levam a uma elevada formação de armadilhas extracelulares denominadas de NET (do inglês, *neutrophil extracellular-trap*) cujo principal objetivo é a captura de bactérias e o combate à infecção (Semmler *et al.*, 2020; Shaul e Fridlender, 2019). No que respeita a outras células do sistema imune inato, como as células NK (do inglês *natural killer cells*) e os mastócitos, ainda não existem evidências neste contexto imunológico do cancro. Similarmente a estas células, também os fundamentos acerca da resposta das células do sistema imune adaptativo são poucos, reportando apenas uma menor sensibilidade das células T à apoptose após o tratamento (Bekeschus *et al.*, 2013; Semmler *et al.*, 2020).

Quanto à segunda hipótese colocada, existem evidências crescentes de que a morte celular induzida por oxidação, como a morte celular induzida pelo PFA, ocorre de maneira pró-imunogénica (Semmler *et al.*, 2020). A morte celular imunogénica é uma forma de morte celular regulada que se caracteriza pela capacidade de induzir uma resposta imune adaptativa num ambiente imunocompetente (Ahmed e Tait, 2020). Após indução de ICD, as células cancerígenas em stress ou morte celular, libertam antigénios tumorais e padrões moleculares associados a danos, denominados DAMPs (do inglês *damage-associated molecular patterns*) que estimulam os recetores de reconhecimento das células dendríticas levando à ativação de células T. Por sua vez, estas proliferam através do sangue e, quando atingem o microambiente tumoral, levam à lise das células tumorais alvo, erradicando o tumor (Ahmed e Tait, 2020; Semmler *et al.*, 2020). Este tipo de morte já foi reportado nalguns estudos *in vitro* com PFA, no entanto os mecanismos pelos quais ocorre ainda não são totalmente conhecidos (Bekeschus *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2015, 2019; Semmler *et al.*, 2020). Adicionalmente, em estudos pré-clínicos realizados com modelos animais de melanoma e cancro do pâncreas, foi demonstrado um aumento de células T intra-tumorais, confirmando a hipótese de que o sistema imune está envolvido (Liedtke *et al.*, 2018; Semmler *et al.*, 2020).

Desta forma, tendo em conta o potencial terapêutico em oncologia do plasma frio atmosférico, este trabalho pretende avaliar a sua eficácia no carcinoma hepatocelular.

Capítulo II

Objetivos

As terapias atualmente disponíveis para o carcinoma hepatocelular estão associadas a baixa eficácia e efeitos adversos, por vezes graves. A ausência de seletividade destes tratamentos para as células tumorais, leva ao dano e morte de outras populações celulares, pondo em risco a vida dos doentes. Avanços científicos têm permitido o desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e tratamento desta neoplasia, no entanto surge ainda a necessidade de uma opção terapêutica mais eficaz e mais segura.

Assim, este projeto tem como objetivo avaliar, *in vitro*, o potencial do tratamento direto com plasma frio atmosférico em diferentes linhas celulares representativas de carcinoma hepatocelular.

Inicialmente, pretende-se avaliar o potencial efeito citotóxico do tratamento direto com plasma frio atmosférico nas diferentes linhas celulares, através da determinação da atividade metabólica e conteúdo proteico, após vários tempos de exposição à terapia. Em seguida, pretende-se uma maior clarificação das alterações celulares desencadeadas pelo plasma frio atmosférico em células de carcinoma hepatocelular, e dos mecanismos de ação subjacentes a essas alterações. Para tal, serão realizados ensaios de natureza celular e molecular, nomeadamente ensaios de avaliação da viabilidade e morte celular, potencial de membrana mitocondrial e quantificação de espécies reativas. Com vista a validar os resultados anteriores, pretende-se ainda fazer uma análise morfológica das células após tratamento.

Desta forma, este trabalho experimental tem como objetivo clarificar os efeitos da aplicação direta do plasma frio atmosférico, bem como os mecanismos de ação responsáveis por induzir alterações celulares nas linhas de carcinoma hepatocelular. Para além disso, pretende contribuir para o desenvolvimento de estudos futuros tendo em vista a translação clínica do plasma frio atmosférico para o tratamento de carcinoma hepatocelular.

Capítulo III

Materiais e Métodos

3.1. Culturas Celulares

Para a realização deste projeto foram utilizadas três linhas celulares humanas representativas de carcinoma hepatocelular. As linhas celulares HepG2 (ATCC® HB-8065™) e Hep3B (ATCC® HB-8064™), adquiridas à ATCC (*American Type Culture Collection*), e a linha celular Huh7 (JCRB0403) disponibilizada pela JCRB (*Japanese Collection of Research Bioresources*). Todas as linhas celulares anteriormente referidas foram mantidas em condições ótimas de crescimento celular, em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% CO₂, a 37°C, numa incubadora (Binder C-150, Binder).

A seleção das diferentes linhas foi feita com base na sua diferente expressão da P53, uma proteína de supressão tumoral, uma vez que esta proteína está muitas vezes relacionada com a sensibilidade aos tratamentos.

A linha celular HepG2, uma linha isolada a partir de uma biópsia de fígado de um doente do sexo masculino, caucasiano, de 15 anos de idade, com um carcinoma hepatocelular bem diferenciado, expressa a forma normal da proteína P53 (wtP53) (Donato, Tolosa e Lechón, 2015). A linha celular Huh7, proveniente de tecido de carcinoma hepatocelular, cirurgicamente retirado a um doente japonês, do género masculino, de 57 anos de idade, apresenta uma mutação no gene *TP53*, codão 220, exão 6 que induz uma sobre-expressão desta proteína (Kawamoto *et al.*, 2020). Por fim, a linha celular Hep3B, isolada de um fígado humano de um doente do género masculino, de raça negra, de 8 anos de idade, com carcinoma hepatocelular primário, tem o vírus da hepatite B integrado e possui uma deleção homozigótica no exão 11 do gene *TP53* que resulta numa não expressão da proteína P53 (Mišík *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2015).

As linhas celulares foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*; Sigma, F7524), 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Sigma, A5955) e piruvato de sódio (Gibco, 11360) numa concentração de 0,25 mM. Todos os meios de cultura foram ajustados para o pH fisiológico de 7,4.

Na realização dos estudos *in vitro*, as linhas celulares, de cultura aderente, foram destacadas dos frascos de cultura com o auxílio de uma solução de dissociação de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco, 25200). Após a sua adição, as células foram incubadas durante 2 a 4 minutos, a 37°C e 5% CO₂ e, seguidamente, a suspensão celular foi inativada com o respetivo meio de cultura.

Para a determinação da concentração celular, foi utilizado o método de exclusão de azul de tripano, que consiste na diluição de um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano (Sigma, 302643). De seguida, procedeu-se à contagem do número de células, num microscópio invertido (Motic AE31) com ampliação de 100 vezes, com recurso a uma câmara de *Neubauer*.

3.2. Dispositivo de Plasma Frio Atmosférico

No Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foi desenvolvido um equipamento eletrónico capaz de gerar Plasma Frio Atmosférico (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Ferreira, 2019; Lopes, 2018; Oliveira, 2019; Pereira, 2020; Silva-Teixeira *et al.*, 2021; Teixeira, 2017) (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021; Ferreira, 2019; Lopes, 2018; Oliveira, 2019; Pereira, 2020; Silva-Teixeira *et al.*, 2021; Teixeira, 2017). Este dispositivo, de corrente contínua, é capaz de gerar uma descarga de elevada voltagem, através de uma agulha esterilizada com 0,9 mm de raio e 40 mm de comprimento, (*Microlance 3, Becton Dickinson*) que funciona como elétrodo único para a produção de Plasma Frio Atmosférico no ar. Trata-se de um equipamento projetado para produzir uma descarga elétrica entre a ponta da agulha, colocada a 2 mm acima da superfície do meio de cultura celular, e as placas de cultura celular, onde as células estão semeadas. Como complemento, uma outra agulha submersa no meio de cultura das células, funciona como o segundo elétrodo (*grounded electrode*). Assim, as culturas celulares atuam tanto como área alvo, como segundo elétrodo, permitindo a produção de PFA. A intensidade da corrente elétrica registada na agulha em circuito fechado foi de $33 \pm 1 \mu\text{A}$, a tensão calculada foi de aproximadamente $4000 \pm 121 \text{ V}$ e a frequência de pulsos foi de $1000 \pm 10 \text{ Hz}$, cada pulso com $1,0 \pm 0,1 \text{ ms}$ de duração. Este dispositivo encontra-se ainda em fase de submissão de pedido de proteção de propriedade intelectual (Teixeira, 2017).

3.2.1. Tratamento com Plasma Frio Atmosférico

Neste projeto foi utilizada a abordagem direta do tratamento com plasma frio atmosférico, descrita anteriormente.

Assim, com vista a avaliar o efeito citotóxico do tratamento com plasma frio atmosférico, as linhas celulares (Hep3B, Huh7 e HepG2) foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços com uma concentração celular de 150 000 células/mL, num volume de 500 μL /poço. Após incubação de 24h, 48h e 72h, as células foram submetidas ao tratamento

com plasma frio atmosférico, durante 15s, 30s, 60s, 90s e 120s e, em seguida, foram realizados os ensaios de avaliação da citotoxicidade através da atividade metabólica e conteúdo proteico.

Seguidamente, foi feita a quantificação das espécies reativas, nomeadamente espécies reativas de oxigénio, geradas nas células após o tratamento. As células foram semeadas em placas de cultura celular de 24 poços com uma concentração celular de 150 000 células/mL, num volume de 500 µL/poço. Após incubação de 24h, as células foram submetidas ao tratamento durante 15, 60 e 120 segundos, tempos de exposição selecionados em concordância com os resultados obtidos nos ensaios de MTT e SRB. O conteúdo intracelular de peróxidos, radical superóxido, foi avaliado 2h, 6h e 24h após o tratamento com PFA, por fluorescência, com recurso às sondas DCFH₂-DA, DHE, respetivamente.

Com recurso à citometria de fluxo, foi avaliada a viabilidade e o perfil de morte celular, alterações no ciclo celular e o potencial da membrana mitocondrial. Para a realização dos ensaios anteriormente referidos, as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços com uma concentração celular de 100 000 células/mL, num volume de 500 µL/poço. Após 24h, as células foram submetidas ao tratamento com plasma frio atmosférico, durante 15, 60 e 120s e, 48h após o tratamento, foram realizados os ensaios.

De forma a complementar os resultados obtidos na citometria de fluxo, foram ainda realizados ensaios de avaliação da morfologia celular através da coloração May-Grünwald Giemsa.

Em todos os ensaios realizados, foram utilizados controlos negativos, ou seja, células que não foram expostas ao tratamento com PFA.

3.3. Estudos de Citotoxicidade

O efeito citotóxico do PFA foi avaliado, nas três linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular, 24h, 48h e 72h após o tratamento. Para tal, foram realizados ensaios de MTT e de SRB.

3.3.1. Avaliação da atividade metabólica pelo ensaio de MTT

A atividade metabólica foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT (do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). O MTT é um reagente de tetrazólio, de cor amarela, que sofre redução por enzimas mitocondriais, como por exemplo

desidrogenases, em células viáveis. Isto, resulta numa conversão do MTT em cristais roxos de formazano insolúveis em meio aquoso (Präbst *et al.*, 2017).

Após 24h, 48h e 72h do tratamento com PFA, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS (do inglês *phosphate buffer saline*: 137 mM de NaCl [Sigma, S7653], 2,7 mM de KCl [Sigma, P9333], 10 mM de Na₂HPO₄·2H₂O [Sigma, S5011] e 2 mM de KH₂PO₄ [Sigma, P0662], pH 7,4). Seguidamente, foram adicionados 300 µL/poço de solução de MTT (Appllichem, A2231-0005) na concentração de 0,5 mg/mL, pH 7,4, e as células foram incubadas a 37°C, no escuro, durante pelo menos 2 horas.

Para a solubilização dos cristais de formazano formados, foram adicionados 300 µL/poço de uma solução de isopropanol (Sigma, 278475) com 40 mM de ácido clorídrico fumante a 37% (Merck Millipore, 100317). As placas ficaram em agitação durante cerca de 30 min e, posteriormente, foi lida a sua absorvância nos comprimentos de onda 570 nm e 620 nm, num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®).

Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de atividade metabólica, com normalização ao controlo.

3.3.2. Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio do SRB

O conteúdo proteico foi avaliado através do ensaio colorimétrico de SRB (do inglês *sulforhodamine B*). Este ensaio baseia-se essencialmente na capacidade do corante SRB para se ligar electrostaticamente a resíduos de aminoácidos das proteínas celulares. Assim, a quantidade de corante ligado permite uma extrapolação da massa celular e conseqüente avaliação da proliferação celular (Orellana e Kasinski, 2016; Vichai e Kirtikara, 2006).

Após 24h, 48h e 72h do tratamento com PFA, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Seguidamente, as células foram fixadas com 300 µL/poço de solução gelada de ácido acético (Sigma, 109088) a 1% em metanol (Sigma, 322415), durante 1 hora, a 4°C. Findo esse tempo, a solução de fixação anteriormente referida foi retirada e as placas foram colocadas a secar. Uma vez secas, foram incubadas, durante 1 hora, com 300 µL/poço de solução de SRB a 0,4% (S9012 Sigma, EUA), à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, os poços foram lavados com água, e foi adicionado um volume de 300 µL/poço de Tris-NaOH, na concentração de 10 mM, a pH 10 (Sigma, T1503). As placas ficaram em agitação durante cerca de 30 min e em seguida foi lida a sua absorvância com os comprimentos de onda 540 nm e 690 nm, num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®).

Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de conteúdo proteico, com normalização ao controlo.

3.4. Viabilidade e morte celulares

A apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo de eliminação de células indesejadas do nosso sistema, caracterizado pela condensação da cromatina, redução do volume celular e clivagem do DNA. Para além disso, é também acompanhada de uma perda da assimetria da membrana fosfolipídica, o que resulta na exposição de fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, à superfície da célula. Esta translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática, é fundamental para que as células apoptóticas possam ser reconhecidas e eliminadas pelos macrófagos (D'Arcy, 2019; Koopman *et al.*, 1994). Para além da morte por apoptose, as células podem experimentar outros tipos de morte celular, como por exemplo a necrose. Contrariamente à apoptose, esta é uma morte celular descontrolada caracterizada por lesão celular e eventual morte, devido a processos patológicos. Este tipo de morte celular, resulta num aumento de volume dos organelos celulares, rutura da membrana e eventual lise da célula com derramamento do conteúdo intracelular para o tecido circulante, causando danos (D'Arcy, 2019).

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular e, conseqüentemente, os tipos de morte celular induzidos pelo tratamento com plasma frio atmosférico, recorreu-se a citometria de fluxo com dupla marcação com anexina-V (AV) e iodeto de propídeo (IP).

A anexina V é uma molécula que apresenta grande afinidade e especificidade para fosfolípidos de carga negativa, tais como a fosfatidilserina. Assim, quando conjugada com um fluorocromo, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*), permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana celular e, deste modo, identificar as células na fase inicial da apoptose. No entanto, a translocação da fosfatidilserina não ocorre exclusivamente em células apoptóticas, com a membrana íntegra, podendo também ocorrer em células que estão a entrar em necrose. Deste modo, a realização de um teste de exclusão com iodeto de protídeo é essencial (Engeland, van *et al.*, 1998; Mariotti *et al.*, 2017; Vermes *et al.*, 1995).

O iodeto de propídeo, é um composto fluorescente que tem a capacidade de se intercalar na dupla cadeia de DNA, de células com a integridade membrana comprometida, tais como as células necróticas. Contudo, a perda da integridade membrana não é

característica exclusiva destas células, uma vez que em fases mais avançadas de apoptose, ocorre rutura da membrana citoplasmática, permitindo a entrada de IP. Deste modo, com a dupla marcação com AV e IP, é possível distinguir quatro populações celulares distintas: as células vivas que se apresentam negativas para ambas as marcações, as células em apoptose inicial que se apresentam positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para marcação com IP, as células em apoptose tardia/necrose que se apresentam positivas para ambas as marcações, e as células necróticas que se apresentam positivas para a marcação com IP e negativas para a AV (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Engeland, van *et al.*, 1998; Mariotti *et al.*, 2017).

A Figura 13 ilustra as diferentes populações celulares.

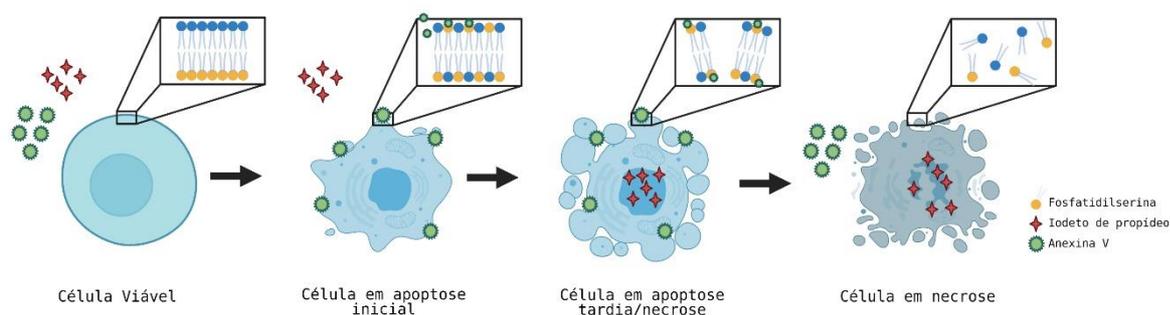


Figura 13 - Representação da interação anexina-V e iodeto de propídeo com os diferentes tipos de populações celulares - A fosfatidilserina (FS) encontra-se no folheto interno da membrana plasmática, íntegra, de uma célula viável, não havendo ligação de AV nem iodeto de propídeo (IP). A FS sofre uma translocação para o folheto externo da membrana de células apoptóticas, verificando-se ligação de AV, mas não de IP. Ocorre uma disrupção da membrana celular em células em apoptose tardia/ necrose, observando-se ligação de AV à FS e do IP ao DNA. Células em necrose sofrem uma completa perda de integridade da membrana, sendo que apenas o IP se liga ao DNA. Baseado em (Crowley *et al.*, 2016).

Assim, 48 horas após o tratamento com PFA, 6×10^5 células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após descartar o sobrenadante, as células foram incubadas com 100 μ L de tampão de ligação (0,01 M de Hepes [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl e 0,25 mM de CaCl_2 [Sigma, C4901]), 2,5 μ L de AV-FITC (Immunostep, ANXVKF) e 1 μ L de IP (Immunostep, ANXVKF) durante 15 minutos a 37°C, na ausência de luz. Após incubação, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação e procedeu-se a análise num citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), usando o comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimentos de onda de emissão de 533 nm para a AV-FITC e de 640 nm para o IP.

Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações: células viáveis (V), células em apoptose inicial (A), células em apoptose tardia/necrose (A/N) e células em necrose (N).

3.5. Avaliação do ciclo celular

Muitas vezes, a morte ou inibição da proliferação estão associadas a bloqueios em fases específicas do ciclo celular. Assim sendo, para avaliar a existência de bloqueios no ciclo celular, como resposta ao tratamento com plasma frio atmosférico, realizou-se um ensaio de citometria com recurso ao iodeto de propídeo (IP). Como referido anteriormente, o iodeto de propídeo (IP), tem a capacidade de se intercalar no DNA, podendo também interagir com o RNA. Assim, de modo a obter-se uma marcação específica para o DNA, é necessária a remoção do RNA por incubação com RNase. Como resultado, a quantidade de corante ligado irá ser proporcional à quantidade de DNA existente nas células, permitindo a identificação das diferentes populações celulares em fases distintas do ciclo celular (G_0/G_1 , a fase S e as fases G_2/M). Por vezes, é ainda possível a identificação de uma população celular adicional, células apoptóticas com DNA fracionado, através do pico pré- G_0/G_1 , também denominado de pico apoptótico (Darzynkiewicz, Bedner e Smolewski, 2001).

Assim, 48 horas após o tratamento com PFA, 6×10^5 células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300xG. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas nas condições anteriormente descritas. Após descartar o sobrenadante, as células foram fixadas com 200 μ L etanol (Sigma, 24102) a 70% e incubadas durante 30 minutos a 4°C. Após incubação, foram adicionados 2 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Seguidamente, as células foram incubadas com 200 μ L de uma solução de IP/RNase (Immunostep, PI/RNase) durante 15 minutos, no escuro. A análise foi realizada no citómetro de fluxo FACSCalibur com os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 640 nm.

Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações: pré- G_0/G_1 , G_0/G_1 , S e G_2/M .

3.6. Avaliação do potencial de membrana

O potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), gerado pelas bombas de prótons, é um componente essencial no processo de armazenamento de energia, durante a fosforilação oxidativa. Para além disso, é também um fator determinante na viabilidade celular, uma vez que a sua alteração, em situações de stresse, é um dos eventos iniciais da apoptose (Bedner *et al.*, 1999; Zorova *et al.*, 2018).

Uma das abordagens mais comuns para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é a utilização da sonda fluorescente JC-1 (do inglês *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboxyanine iodide*). O JC-1 é um fluorocromo lipofílico catiónico capaz de formar agregados (A) ou monómeros (M) consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial. Em células viáveis, cuja membrana mitocondrial se encontra polarizada, o JC-1 acumula-se na mitocôndria, formando agregados que, quando excitados, emitem fluorescência no comprimento de onda do vermelho (590 nm). Em casos de stresse celular ou mesmo apoptose, há uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, levando a um estado de despolarização. Nestas condições, a mitocôndria não retém o fluorocromo, ficando este disperso no citoplasma sob a forma de monómeros, que quando excitados emitem fluorescência no comprimento de onda verde (527 nm). Isto leva a uma alteração reversível da cor do fluorocromo de vermelho para verde. Desta forma, o rácio da fluorescência dos monómeros e agregados (M/A) fornece uma estimativa do estado do potencial de membrana mitocondrial. Quanto maior este rácio, maior a disfunção ao nível da mitocôndria (Bedner *et al.*, 1999; Cossarizza *et al.*, 1993; Perry *et al.*, 2011; Solaini *et al.*, 2007; Zorova *et al.*, 2018).

Assim, 48 horas após o tratamento com PFA, 6×10^5 células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas nas condições anteriormente descritas. Após descartar o sobrenadante, as células foram incubadas com 1 mL de PBS e 5 $\mu\text{g/mL}$ da sonda JC-1, (Sigma, T4069) durante 15 minutos, a 37°C, na ausência de luz. Após incubação, foram adicionados 2 ml de tampão de PBS e o conteúdo celular foi novamente centrifugado durante 5 min a 1300 xG. Por último, foram adicionados 400 μL de PBS e procedeu-se a análise num citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), usando o comprimento de onda de excitação de 590 nm para os agregados e de 530 nm para os monómeros. Os resultados são apresentados como a variação da razão das intensidades de fluorescência de monómeros/agregados (M/A), normalizada ao controlo.

3.7. Espécies reativas de oxigênio

As células tumorais produzem elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio e hidrogênio e, embora isto aumente a sua capacidade proliferativa, elevados níveis podem levar à sua morte por apoptose (Braný *et al.*, 2020). Para a avaliação das espécies reativas produzidas, nomeadamente o conteúdo celular de superóxidos e do anião superóxido, foram realizados ensaios de fluorescência 2, 6 e 24 horas após o tratamento das linhas celulares de carcinoma hepatocelular com PFA.

3.7.1. Análise do conteúdo intracelular de peróxidos

A quantificação intracelular de peróxidos foi efetuada através da oxidação intracelular da sonda não fluorescente DCFH₂-DA (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). O composto, uma vez dentro da célula, é metabolizado, por estereases intracelulares, em DCFH (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*), impermeável à membrana. Na presença de peróxidos, este sofre oxidação dando origem a DCF (do inglês *2',7'-dichlorofluorescein*), um produto fluorescente e detetável (Fuloria *et al.*, 2021; Tarpey, Wink e Grisham, 2004).

Para a avaliação dos peróxidos intracelulares, 2, 6 e 24 horas após o tratamento com PFA, 9×10^5 células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG. Após lavagem com PBS, as células foram novamente centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG e foram adicionados 500 µL de PBS. Seguidamente, as células foram incubadas com 0,5 µM da sonda DCFH₂-DA (Invitrogen, D-399) durante 45 minutos a 37°C, no escuro. Por último, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG e a leitura foi realizada num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 528 nm. Os resultados são apresentados como a média das intensidades de fluorescência (MIFs) normalizada ao controlo.

3.7.2. Análise do conteúdo intracelular de radical superóxido

Com vista a analisar o conteúdo intracelular do anião superóxido, foi utilizada a sonda DHE (do inglês *dihydroethidium*). Este composto, uma vez dentro da célula, é oxidado pelo anião superóxido e forma um composto vermelho fluorescente que intercala no DNA, o 2-hidroxiétiódo (2-O-HE⁺). Assim, através da fluorescência, é possível estimar a presença deste

radical no interior da célula. Embora, esta sonda seja relativamente específica para a detecção do superóxido, a DHE também pode sofrer oxidação por ONOO^- ou OH^\cdot e originar um outro composto, o etídeo (E^+) (Dikalov e Harrison, 2014; Fuloria *et al.*, 2021; Wojtala *et al.*, 2014).

Para a avaliação do conteúdo intracelular do anião superóxido, 2, 6 e 24 horas após o tratamento com PFA, 9×10^5 células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG. Após lavagem com PBS, as células foram novamente centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG e foram adicionados 500 μL de PBS. Seguidamente, as células foram incubadas com 2,5 μM da sonda DHE (Sigma, D7008) durante 15 minutos a 37°C, no escuro. Por último, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1300 xG e a leitura foi realizada num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com comprimentos de onda de excitação de 530 nm e de emissão de 645 nm. Os resultados são apresentados como a média das intensidades de fluorescência (MIFs) normalizada ao controlo.

3.8. Análise morfológica

A análise das características morfológicas das células permite a avaliação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento direto com PFA. Para tal foi utilizada a técnica de May-Grünwald-Giemsa por microscopia ótica através de esfregaços de células e coloração dos mesmos com o corante May-Grünwald-Giemsa (Nogueira *et al.*, 2020). Esta coloração permite, assim, a visualização dos componentes intracelulares e dos núcleos que coram rosa-laranja e roxo, respetivamente (Piaton *et al.*, 2016).

Assim, 48 horas após o tratamento com PFA, foram destacadas 100 000 células de cada condição e foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS. De seguida, foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. As células obtidas, foram ressuspensas em 25 μL de FBS, de forma a melhorar a sua adesão à lâmina. Após ressuspensão do conteúdo celular, procedeu-se à realização dos esfregaços e deixaram-se as lâminas a secar durante, pelo menos, 30 minutos. As lâminas foram fixadas durante 5 minutos em metanol. Posteriormente, procedeu-se à coloração com a solução de May-Grünwald (Merck Millipore, 101424) durante 4 minutos e, de seguida, com solução de Giemsa (Merck Millipore, 109204) a 5% em PBS, durante 15 minutos. Por fim, os esfregaços foram lavados com PBS e deixados a secar ao ar. Posteriormente, para observação das lâminas e obtenção

das fotografias foi utilizado o microscópio ótico Nikon Eclipse Ni equipado com Nikon Digital Camera DS-Fi2.

Para cada linha celular os resultados são apresentados de forma qualitativa, com 3 fotografias representativas para cada condição.

3.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software IBM SPSS Statistics* versão 27 para Windows (*GraphPad Software, La Jolla California EUA*). A avaliação da normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi feita de acordo com o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade de variâncias foi realizada de acordo com o teste de *Levene*.

Para a comparação dos tempos de exposição ao plasma para cada tempo de avaliação em relação ao controlo, tratando-se de valores normalizados ao controlo, foi realizado o *Wilcoxon signed-rank test*.

Nas comparações múltiplas entre tempos de exposição ao plasma, tempos de avaliação ou linhas celulares foram utilizados testes paramétricos, no caso de se verificar uma distribuição normal, e testes não paramétricos, em caso contrário. A análise foi feita com recurso ao teste *One-way Analysis of Variance (One-way ANOVA)*, se a amostra apresentasse uma distribuição normal, e pelo teste *Kruskal-Wallis* caso não se verificasse a última condição. Para cada análise, as comparações múltiplas em caso de variâncias não presumidas foram realizadas segundo o teste de *Games-Howell* ou segundo o teste de *Tukey* em caso contrário.

Para todas as comparações foi considerado um valor de significância de 0,05.

Capítulo IV

Resultados

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos da realização dos ensaios detalhados na secção anterior “Materiais e Métodos”, de forma a avaliar os efeitos induzidos pelo plasma frio atmosférico *in vitro*, nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular consideradas nesta dissertação.

4.1. Estudos de Citotoxicidade

De forma a avaliar a toxicidade induzida pelo PFA nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, foram realizados os ensaios de MTT e de SRB, 24h, 48h e 72h após exposição ao tratamento. No ensaio de MTT foi avaliado o efeito do PFA na atividade metabólica, enquanto no ensaio de SRB foi avaliado o seu efeito no conteúdo proteico. Para ambos os casos, utilizaram-se os tempos de exposição ao plasma frio atmosférico de 15, 30, 60, 90 e 120 segundos.

4.1.1. Atividade metabólica

Na Figura 14 estão representados os resultados da atividade metabólica das linhas celulares HuH7 (Figura 14A), HepG2 (Figura 14B) e Hep3B (Figura 14C), após exposição ao plasma frio durante 15, 30, 60, 90 e 120 segundos. Os resultados estão expressos em percentagem de atividade metabólica, normalizada ao controlo. De um modo geral, verificou-se uma diminuição da atividade metabólica com o aumento do tempo de exposição e com o aumento do tempo de avaliação após a realização do tratamento com PFA (Figura 14).

Considerando os resultados obtidos na linha celular HuH7 (Figura 14A), 24 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição de 15s ao PFA ($90,37 \pm 1,55\%$, $p < 0,001$), de 30s ($75,37 \pm 1,72\%$, $p < 0,001$), de 60s ($66,00 \pm 1,16\%$, $p < 0,001$), de 90s ($65,50 \pm 1,98\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($39,86 \pm 2,92\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado graficamente na Figura 14A. Desta forma, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA com tempos mais

longos induziu um decréscimo significativo da atividade metabólica comparativamente aos tempos de exposição mais curtos ao PFA ($p < 0,001$).

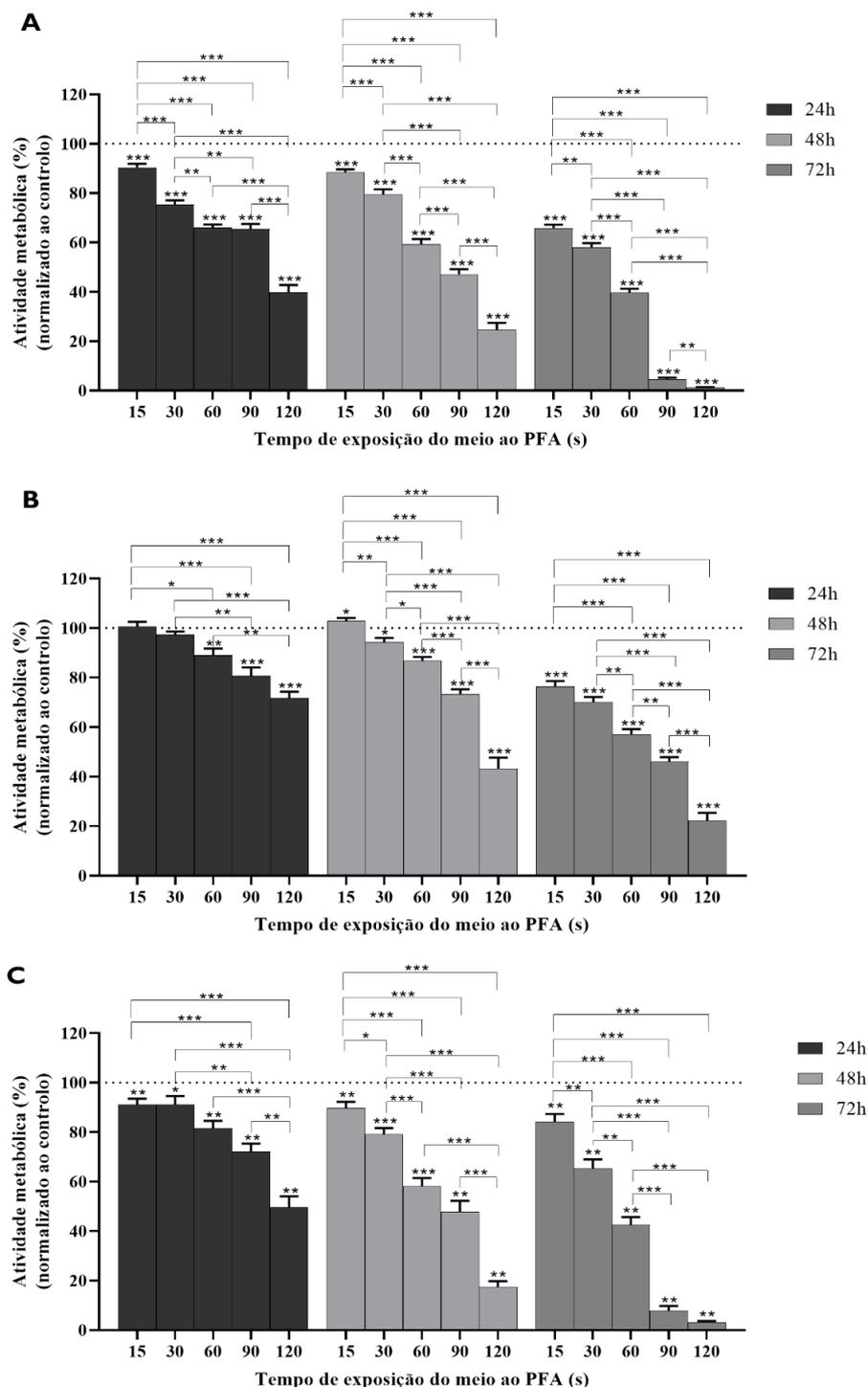


Figura 14 - Atividade metabólica após exposição ao tratamento com PFA. O PFA diminuiu a atividade metabólica, avaliada através do ensaio de MTT, das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B (C), de forma dependente do tempo de exposição e incubação após o tratamento. Os ensaios foram realizados 24, 48 e 72 horas após tratamento com PFA. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão, da percentagem de atividade metabólica normalizada ao controlo ($n \geq 3$ experiências independentes em triplicado). Os * representam as diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição e o controlo, bem como entre os diferentes tempos de exposição: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Relativamente aos resultados obtidos 48 horas após o tratamento (Figura 14A), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição de 15s ($88,43 \pm 1,21\%$, $p < 0,001$), de 30s ($79,51 \pm 2,03\%$, $p < 0,001$), de 60s ($59,39 \pm 2,00\%$, $p < 0,001$), de 90s ($47,10 \pm 2,10\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($24,48 \pm 2,94\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado na Figura 14A. Assim, verificou-se que a exposição a tempos de exposição mais longos ao PFA induziu um decréscimo significativo da atividade metabólica, comparativamente aos tempos de exposição mais curtos ao PFA ($p < 0,001$ para todas as comparações entre os tempos de exposição).

Na análise dos resultados obtidos 72 horas após o tratamento (Figura 14A), foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição de 15s ($65,82 \pm 1,40\%$, $p < 0,001$), de 30s ($58,08 \pm 1,63\%$, $p < 0,001$), de 60s ($39,61 \pm 1,61\%$, $p < 0,001$), de 90s ($4,52 \pm 0,75\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($1,25 \pm 0,15\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Tendo em consideração os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou novamente a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado na Figura 14A. Assim, observou-se que exposição a tempos mais longos induziu um maior decréscimo significativo da atividade metabólica, comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ para a generalidade das comparações entre os diferentes tempos de exposição).

Neste estudo, analisou-se também se o tempo decorrido após a exposição ao tratamento com PFA poderia influenciar os efeitos induzidos na atividade metabólica. De uma forma geral, foi possível observar um decréscimo da atividade metabólica com o aumento do tempo após exposição ao plasma frio atmosférico. Foi, pois, possível verificar que 72h após o tratamento com PFA se verificou um decréscimo significativo da atividade metabólica comparativamente após 48h e após 24h, para todos os tempos de exposição ao PFA ($p < 0,001$).

Quanto aos resultados obtidos na linha celular HepG2 (Figura 14B), 24 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição ao PFA de 60s ($88,91 \pm 2,82\%$, $p = 0,002$), de 90s ($80,72 \pm 3,40\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($71,63 \pm 2,69\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Os resultados obtidos para cada tempo de exposição, permitiram verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado

graficamente na Figura 14B. Desta forma, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA com tempos mais longos induziu um decréscimo da atividade metabólica significativo, comparativamente à exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ na maioria das comparações entre os diferentes tempos de exposição ao PFA).

Considerando os resultados obtidos 48 horas após o tratamento (Figura 14B), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição de 30s ($94,32 \pm 1,70\%$, $p = 0,012$), de 60s ($86,69 \pm 1,62\%$, $p < 0,001$), de 90s ($73,38 \pm 1,91\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($43,28 \pm 4,37\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como referido anteriormente, representado na Figura 14B. Assim, verificou-se que a exposição a tempos mais longos do tratamento com PFA de 120s induziu um decréscimo significativo da atividade metabólica, comparativamente a uma exposição a tempos de exposição mais curtos ($p < 0,001$ para a generalidade das comparações entre os tempos de exposição).

Na análise dos resultados obtidos 72 horas após o tratamento (Figura 14B), foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição de 15s ($76,43 \pm 2,18\%$, $p < 0,001$), de 30s ($70,06 \pm 2,14\%$, $p < 0,001$), de 60s ($57,06 \pm 2,12\%$, $p < 0,001$), de 90s ($46,09 \pm 1,815\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($22,19 \pm 3,19\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Tal como verificado após 24h e após 48h, foi possível observar que tempos de exposição ao PFA mais longos induziram um decréscimo significativo da atividade metabólica comparativamente aos tempos mais curtos ($p < 0,001$ para a maioria das comparações entre os tempos de exposição), tal como observado na Figura 14B.

Tal como referido anteriormente, avaliou-se também se o tempo de avaliação decorrido após o tratamento com PFA teria impacto nos resultados obtidos. Nesse sentido, de uma forma geral para todos os tempos de exposição ao plasma, foi verificado um aumento do decréscimo da atividade metabólica com o aumento do tempo decorrido após exposição ao plasma atmosférico frio. Desta forma, foi possível verificar que após 72h se observou um decréscimo da atividade metabólica significativamente superior ao observado após 24h e após 48h, para todos os tempos de exposição ao tratamento com PFA ($p < 0,001$ para a generalidade dos tempos de exposição ao PFA). De igual forma, o decréscimo da atividade metabólica foi significativamente superior 48h após exposição ao tratamento com PFA comparativamente à obtida 24h após o tratamento ($p < 0,001$ para todos os tempos de exposição ao tratamento).

Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular Hep3B (Figura 14C), 24 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição ao PFA de 15s ($91,23 \pm 2,33\%$, $p=0,002$), de 30s ($91,02 \pm 3,57\%$, $p=0,021$), de 60s ($81,56 \pm 3,00\%$, $p=0,001$), de 90s ($72,30 \pm 3,09\%$, $p=0,001$) e de 120s ($49,73 \pm 4,37\%$, $p=0,001$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado graficamente na Figura 14C. Assim, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA com tempos mais longos induziu um decréscimo da atividade metabólica, significativamente superior, comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ na maioria das comparações entre os tempos de exposição).

Considerando os resultados obtidos 48 horas após o tratamento (Figura 14C), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade metabólica após exposição de 15s ($89,77 \pm 2,48\%$, $p=0,001$), de 30s ($79,23 \pm 2,45\%$, $p < 0,001$), de 60s ($58,23 \pm 3,24\%$, $p < 0,001$), de 90s ($47,79 \pm 4,50\%$, $p=0,001$) e de 120s ($17,37 \pm 2,47\%$, $p=0,001$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado na Figura 14C. Desta forma, verificou-se que a exposição ao PFA por tempos mais longos induziu um decréscimo da atividade metabólica significativamente superior, comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ para a generalidade das comparações entre os tempos de exposição considerados).

Analisando os resultados obtidos 72 horas após o tratamento (Figura 14C), foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu, de facto, uma diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica após exposição de 15s ($84,17 \pm 3,20\%$, $p=0,001$), de 30s ($65,43 \pm 3,58\%$, $p=0,001$), de 60s ($42,53 \pm 3,18\%$, $p=0,003$), de 90s ($7,92 \pm 1,83\%$, $p=0,001$) e de 120s ($3,23 \pm 0,45\%$, $p=0,003$), comparativamente ao controlo. Tendo em consideração os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo da atividade metabólica, tal como representado na Figura 14C. Assim, observou-se que a exposição ao tratamento com PFA, com recurso a tempos de exposição mais longos, levou a um decréscimo significativo da atividade metabólica, comparativamente à exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ para a maioria das comparações entre os tempos de exposição).

Tal como estudado nas linhas celulares de estudo anteriores, analisou-se novamente o efeito do tempo decorrido após a exposição ao tratamento com PFA nas diferenças observadas na atividade metabólica. De uma forma geral, foi possível observar um decréscimo da atividade metabólica com o aumento do tempo após exposição ao plasma frio atmosférico. Assim, verificou-se um decréscimo significativo da atividade metabólica 72h após o tratamento após 24h e após 48h ($p < 0,001$ para a generalidade das comparações considerando os diferentes tempos de exposição ao plasma). De igual forma, foi possível também verificar que após 48h ocorreu uma diminuição significativa da atividade metabólica comparativamente aos resultados obtidos após 24h ($p < 0,001$ para a maioria das comparações tendo em conta os resultados obtidos para os diferentes tempos de exposição ao PFA).

No que respeita à comparação entre linhas celulares, os resultados obtidos indicam que para 24h após o tratamento com PFA, a linha HuH7 apresentou uma maior sensibilidade ao tratamento. De uma forma geral, para todos os tempos de exposição ao tratamento com PFA, a linha HuH7 apresentou um decréscimo significativo da atividade metabólica comparativamente às linhas celulares HepG2 ($p < 0,001$ para a generalidade dos tempos de exposição) e Hep3B ($p < 0,01$ para a generalidade dos tempos de exposição ao PFA). De igual forma, a linha celular HepG2 apresentou o menor decréscimo da atividade metabólica após exposição ao tratamento com PFA, demonstrando uma menor sensibilidade ao tratamento ($p < 0,001$ na maioria dos tempos de exposição ao PFA).

Considerando os resultados obtidos 48h após o tratamento com PFA, verificou-se que a maior ou menor sensibilidade das diferentes linhas celulares dependia dos tempos de exposição ao PFA. Assim, após 15s de exposição à terapia, a linha Huh7 foi a que demonstrou uma maior sensibilidade, devido a decréscimo significativo da atividade metabólica relativamente à linha celular HepG2 ($p < 0,001$). Após 30s de exposição ao PFA, foi observado um decréscimo significativo da atividade metabólica da linha celular Hep3B comparativamente à linha celular HepG2 ($p < 0,001$), sendo a linha mais sensível ao tratamento para este tempo de exposição. Relativamente aos 60s de exposição, foi possível observar que a diminuição da atividade metabólica da linha celular Hep3B foi significativamente superior à linha celular HepG2 ($p < 0,001$). Considerando o tempo de exposição de 90s, foi possível verificar uma atividade metabólica significativamente inferior da linha celular Huh7 comparativamente à linha celular HepG2 ($p < 0,001$). Para os 120s após exposição ao PFA, as células Hep3B voltou a demonstrar uma diminuição significativa da atividade metabólica comparativamente às células HepG2 ($p = 0,003$). Em concordância com os resultados das 24h, foi verificado que para todos

os tempos de exposição ao tratamento, a linha celular HepG2 demonstrou uma menor sensibilidade ao tratamento com PFA.

Por último, para os resultados obtidos 72h após o tratamento com PFA, para todas as linhas celulares, foi possível observar que, de uma forma geral, a linha celular HuH7 foi a que apresentou uma maior sensibilidade ao tratamento com plasma atmosférico frio para todos os tempos de exposição, apresentando um decréscimo significativo da atividade metabólica comparativamente à linha celular HepG2 ($p < 0,001$ para todos os tempos de exposição ao PFA) e à linha celular Hep3B ($p = 0,003$ considerando uma exposição ao PFA de 120s). Tal como observado para as 24h e as 48h, a linha celular HepG2 foi a que apresentou uma menor sensibilidade ao tratamento ($p < 0,001$ na generalidade das comparações para os diferentes tempos de exposição ao PFA).

4.1.2. Conteúdo proteico

Na Figura 15 estão representados os resultados da avaliação do conteúdo proteico das linhas celulares HuH7 (Figura 15A), HepG2 (Figura 15B) e Hep3B (Figura 15C), após exposição ao plasma frio durante 15, 30, 60, 90 e 120 segundos. Os resultados são expressos em percentagem de conteúdo proteico normalizada ao controlo.

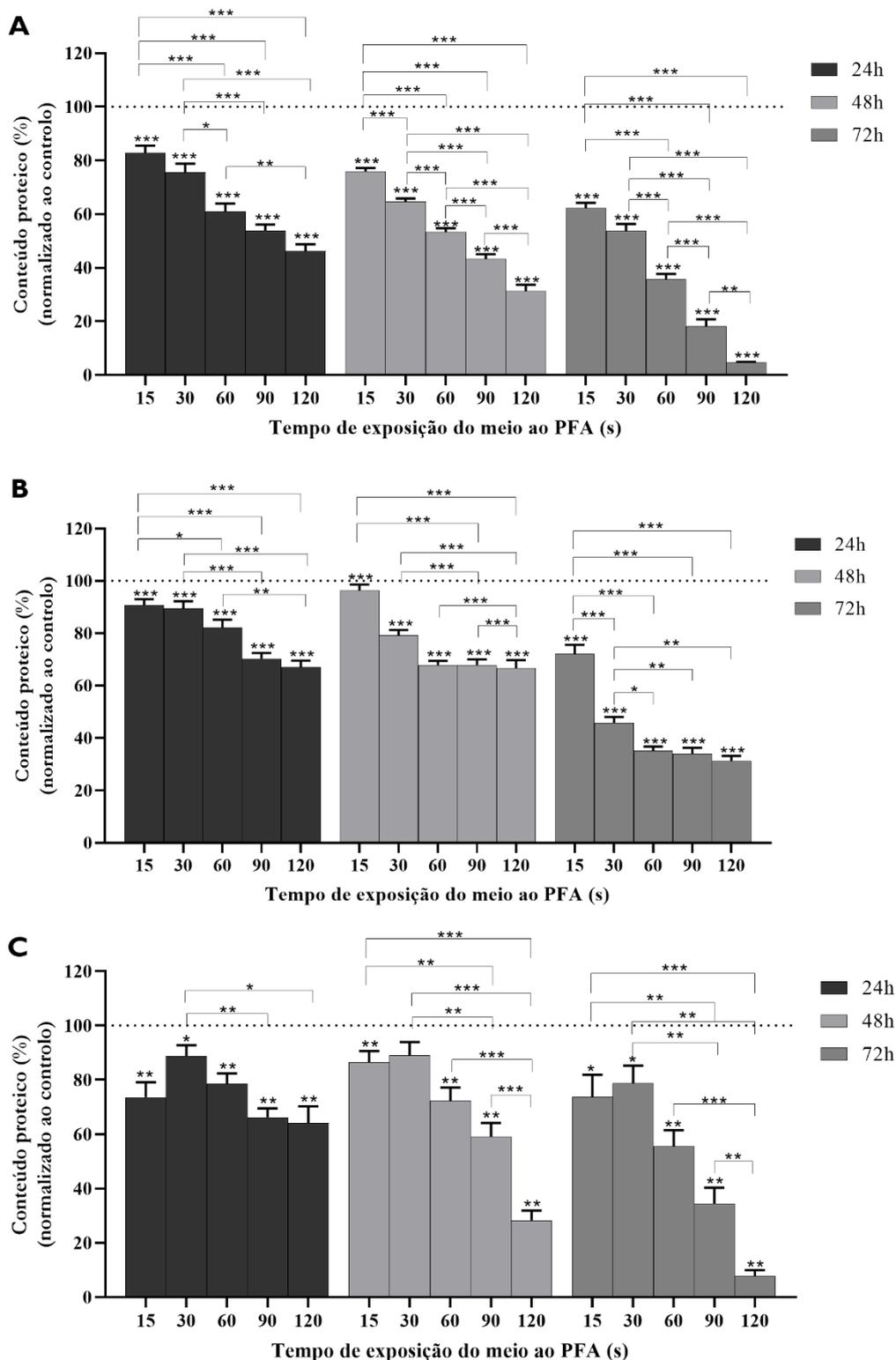


Figura 15 - Conteúdo proteico após exposição ao tratamento com PFA. O PFA diminuiu o conteúdo proteico, avaliado pelo ensaio de SRB, das linhas celulares HuH7 (A), HepG2 (B) e Hep3B (C), de forma dependente do tempo de exposição e incubação após o tratamento. Os ensaios foram realizados 24, 48 e 72 horas após tratamento com PFA. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão, da percentagem de conteúdo proteico normalizada ao controle (n≥3 experiências independentes em triplicado). Os * representam as diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição e o controle, bem como entre os diferentes tempos de exposição: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Em similaridade com os resultados obtidos para a atividade metabólica, de uma forma geral, verificou-se uma diminuição do conteúdo proteico com o aumento do tempo de exposição e com o aumento do tempo de avaliação após a realização da terapia (Figura 15).

Considerando os resultados obtidos na linha celular HuH7 (Figura 15A), 24 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo proteico, após exposição ao PFA de 15s ($82,81 \pm 2,72\%$, $p < 0,001$), de 30s ($75,55 \pm 3,25\%$, $p < 0,001$), de 60s ($60,96 \pm 2,98\%$, $p < 0,001$), de 90s ($53,95 \pm 2,19\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($46,20 \pm 2,51\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado graficamente na Figura 15A. Assim, de forma geral, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA com recurso a tempos mais longos induziu um decréscimo significativo do conteúdo proteico comparativamente a tempos de uma exposição mais curtos ($p < 0,001$ para a generalidade das comparações entre os tempos de exposição).

Quanto aos resultados obtidos 48 horas após o tratamento (Figura 15A), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, do conteúdo proteico após exposição de 15s ($75,92 \pm 1,26\%$, $p < 0,001$), de 30s ($64,61 \pm 1,25\%$, $p < 0,001$), de 60s ($53,42 \pm 1,35\%$, $p < 0,001$), de 90s ($43,39 \pm 1,61\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($31,18 \pm 2,42\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado na Figura 15A. Assim, verificou-se que a exposição a tempos mais longos com PFA induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior, comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ para todas as comparações entre os tempos de exposição).

Na análise dos resultados obtidos 72 horas após o tratamento (Figura 15A), foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, do conteúdo proteico após exposição de 15s ($62,25 \pm 1,95\%$, $p < 0,001$), de 30s ($53,72 \pm 2,60\%$, $p < 0,001$), de 60s ($35,76 \pm 1,94\%$, $p < 0,001$), de 90s ($18,11 \pm 2,65\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($4,69 \pm 0,27\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Tendo em consideração os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição leva a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado na Figura 15A. Assim, observou-se que maiores tempos de exposição ao tratamento com PFA induziram um decréscimo do conteúdo proteico

significativamente superior ao observado com a exposição a tempos menores ($p < 0,001$ para a generalidade das comparações efetuadas).

Neste estudo, analisou-se também se o tempo decorrido após a exposição ao tratamento com PFA poderia influenciar os efeitos induzidos no conteúdo proteico. Nesse sentido, e de forma geral, foi possível observar um decréscimo do conteúdo proteico com o aumento do tempo após a exposição ao plasma frio atmosférico. Desta forma, na generalidade, para os diferentes tempos de exposição ao plasma frio atmosférico, foi possível verificar um decréscimo significativo do conteúdo proteico 72h após o tratamento, comparativamente às 24h ($p < 0,001$ para todos os tempos de exposição) e às 48h ($p < 0,001$ para a generalidade dos tempos de exposição). Para além disso, 48h após o tratamento verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo proteico comparativamente às 24h após 30s ($p = 0,016$), 90s ($p = 0,001$) e 120s ($p < 0,001$).

Quanto aos resultados obtidos na linha celular HepG2 (Figura 15B), 24 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo proteico após exposição ao PFA de 15s ($90,76 \pm 2,27\%$, $p < 0,001$), de 60s ($89,47 \pm 2,75\%$, $p < 0,001$), de 90s ($82,19 \pm 3,01\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($67,06 \pm 2,49\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado graficamente na Figura 15B. Desta forma, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA com tempos mais longos induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$, na generalidade das comparações).

Considerando os resultados obtidos 48 horas após o tratamento (Figura 15B), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição, estatisticamente significativa, do conteúdo proteico após exposição de 15s ($96,33 \pm 2,26\%$, $p < 0,001$), de 30s ($79,17 \pm 2,08\%$, $p < 0,001$), de 60s ($67,86 \pm 1,60\%$, $p < 0,001$), de 90s ($67,85 \pm 2,15\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($66,71 \pm 3,08\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado na Figura 15B. Assim, verificou-se que a exposição a tempos mais longos ao tratamento com PFA, nomeadamente exposição a 120s e 90s, induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior, comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$).

Na análise dos resultados obtidos 72 horas após o tratamento (Figura 15B), foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo proteico após exposição de 15s ($72,07 \pm 3,52\%$, $p < 0,001$), de 30s ($45,71 \pm 2,29\%$, $p < 0,001$), de 60s ($35,09 \pm 1,65\%$, $p < 0,001$), de 90s ($33,94 \pm 2,34\%$, $p < 0,001$) e de 120s ($31,27 \pm 1,93\%$, $p < 0,001$), comparativamente ao controlo. Tendo em consideração os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado na Figura 15B. Assim, observou-se que a exposição a tempos mais longos de PFA induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior, comparativamente à exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ para a generalidade das comparações entre os tempos considerados).

Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular Hep3B (Figura 15C), 24 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição, estatisticamente significativa, do conteúdo proteico após exposição ao PFA de 15s ($73,59 \pm 5,57\%$, $p = 0,001$), de 30s ($88,78 \pm 3,98\%$, $p = 0,046$), de 60s ($78,53 \pm 3,87\%$, $p = 0,002$), de 90s ($66,25 \pm 3,27\%$, $p = 0,001$) e de 120s ($64,21 \pm 6,00\%$, $p = 0,001$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado graficamente na Figura 15C. Assim, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA de 120s induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior comparativamente a uma exposição de 30s ($p = 0,026$). Foi também possível verificar que o conteúdo proteico após exposição ao PFA de 90s foi significativamente inferior comparativamente à exposição de 30s ($p = 0,001$).

Considerando os resultados obtidos 48 horas após o tratamento (Figura 15C), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo proteico após exposição de 15s ($86,45 \pm 4,17\%$, $p = 0,008$), de 60s ($72,24 \pm 4,90\%$, $p = 0,003$), de 90s ($59,11 \pm 5,06\%$, $p = 0,001$) e de 120s ($28,30 \pm 13,32\%$, $p = 0,001$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição leva a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado na Figura 15C. Desta forma, verificou-se que a exposição a 120s ao tratamento com PFA induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior, comparativamente a uma exposição a tempos mais curtos ($p < 0,001$). Por último, observou-se ainda que o conteúdo proteico após

exposição ao PFA de 90s foi significativamente inferior comparativamente à exposição de 15s ($p=0,003$) e de 30s ($p=0,002$).

Na análise dos resultados obtidos 72 horas após o tratamento (Figura 15C), foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo proteico após exposição de 15s ($73,81 \pm 8,15\%$, $p=0,016$), de 30s ($78,82 \pm 6,4\%$, $p=0,01$), de 60s ($55,54 \pm 5,91\%$, $p=0,003$), de 90s ($34,42 \pm 5,94\%$, $p=0,002$) e de 120s ($7,86 \pm 2,08\%$, $p=0,003$), comparativamente ao controlo. Tendo em consideração os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo proteico, tal como representado na Figura 15C. Assim, observou-se que a exposição ao tratamento com PFA de 120s induziu um decréscimo do conteúdo proteico significativamente superior, comparativamente a uma exposição de 15s ($p<0,001$), de 30s ($p<0,001$), de 60s ($p<0,001$) e de 90s ($p=0,007$). Por fim, verificou-se também que o conteúdo proteico após exposição ao PFA de 90s foi significativamente inferior comparativamente à exposição de 15s ($p=0,008$) e de 30s ($p<0,001$).

Como estudado nas linhas de estudo anteriores, analisou-se se o tempo decorrido após a exposição ao tratamento com PFA poderia influenciar os efeitos induzidos no conteúdo proteico. Nesse sentido, de forma geral, foi possível observar um decréscimo do conteúdo proteico com o aumento do tempo após exposição ao plasma frio atmosférico. Foi possível verificar um decréscimo significativo do conteúdo proteico 72h após o tratamento comparativamente às 24h após exposição ao PFA de 60s, 90s e 120s comparativamente às 48h ($p=0,007$, $p=0,001$ e $p<0,001$, respetivamente).

No que respeita à comparação entre linhas celulares, os resultados obtidos indicaram que, para as 24h após o tratamento com PFA, a sensibilidade das diferentes linhas celulares ao tratamento depende do tempo de exposição. Desta forma, a linha celular HuH7 foi a que mostrou uma maior sensibilidade, devido a decréscimo significativo do seu conteúdo proteico, após 30s de exposição, relativamente à linha celular Hep3B ($p=0,011$) que, por sua vez, apresentou uma diminuição significativa do conteúdo proteico comparativamente à linha celular HepG2 ($p=0,041$). No que toca a uma exposição de 60s, foi observado um decréscimo significativo do conteúdo proteico da linha celular Huh7 comparativamente à linha celular Hep3B ($p<0,001$). Para os tempos de exposição ao PFA mais longos, a linha celular HuH7 apresentou-se como a mais sensível, com uma diminuição do conteúdo proteico significativa comparativamente à linha celular HepG2 e Hep3B ($p<0,01$ para as comparações consideradas).

De um modo geral, verificou-se que para todos os tempos de exposição ao tratamento, a linha celular HepG2 foi a que demonstrou uma menor sensibilidade ao tratamento com PFA.

Considerando os resultados obtidos 48h após o tratamento com PFA, verificou-se de uma forma geral que a linha celular HuH7 se revelou como a mais sensível ao tratamento, tendo-se verificado uma diminuição significativa do conteúdo proteico comparativamente às linhas celulares HepG2 e Hep3B ($p < 0,01$ para a generalidade das comparações nos diferentes tempos de exposição). Em concordância com os resultados das 24h, foi verificado que para todos os tempos de exposição ao tratamento, a linha celular HepG2 foi a que demonstrou ser mais resistente ao PFA.

Relativamente aos resultados obtidos 72h após o tratamento com PFA, para todas as linhas celulares, foi possível observar que, de uma forma geral, a linha celular Huh7 foi a que mostrou uma maior sensibilidade, devido a um decréscimo significativo do conteúdo em relação às linhas celulares HepG2 e Hep3B ($p < 0,01$ para a generalidade dos tempos de exposição ao PFA). Em concordância com os resultados discutidos anteriormente, foi possível verificar que, de um modo geral, a linha celular HepG2 foi a que apresentou menor sensibilidade ao tratamento com plasma frio atmosférico, em todos os tempos de exposição ao tratamento.

4.2. Viabilidade e perfil de morte celular

Com o intuito de avaliar o tipo de morte celular nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, foram realizados os ensaios de citometria de fluxo, 48h após exposição ao tratamento, com recurso à dupla marcação AV/IP.

Na Figura 16 estão representados os resultados preliminares da viabilidade e do perfil de morte celular das linhas celulares HuH7 (Figura 16A), HepG2 (Figura 16B) e Hep3B (Figura 16C), após exposição ao plasma frio durante 15, 60 e 120 segundos. Os resultados são expressos em percentagem de células.

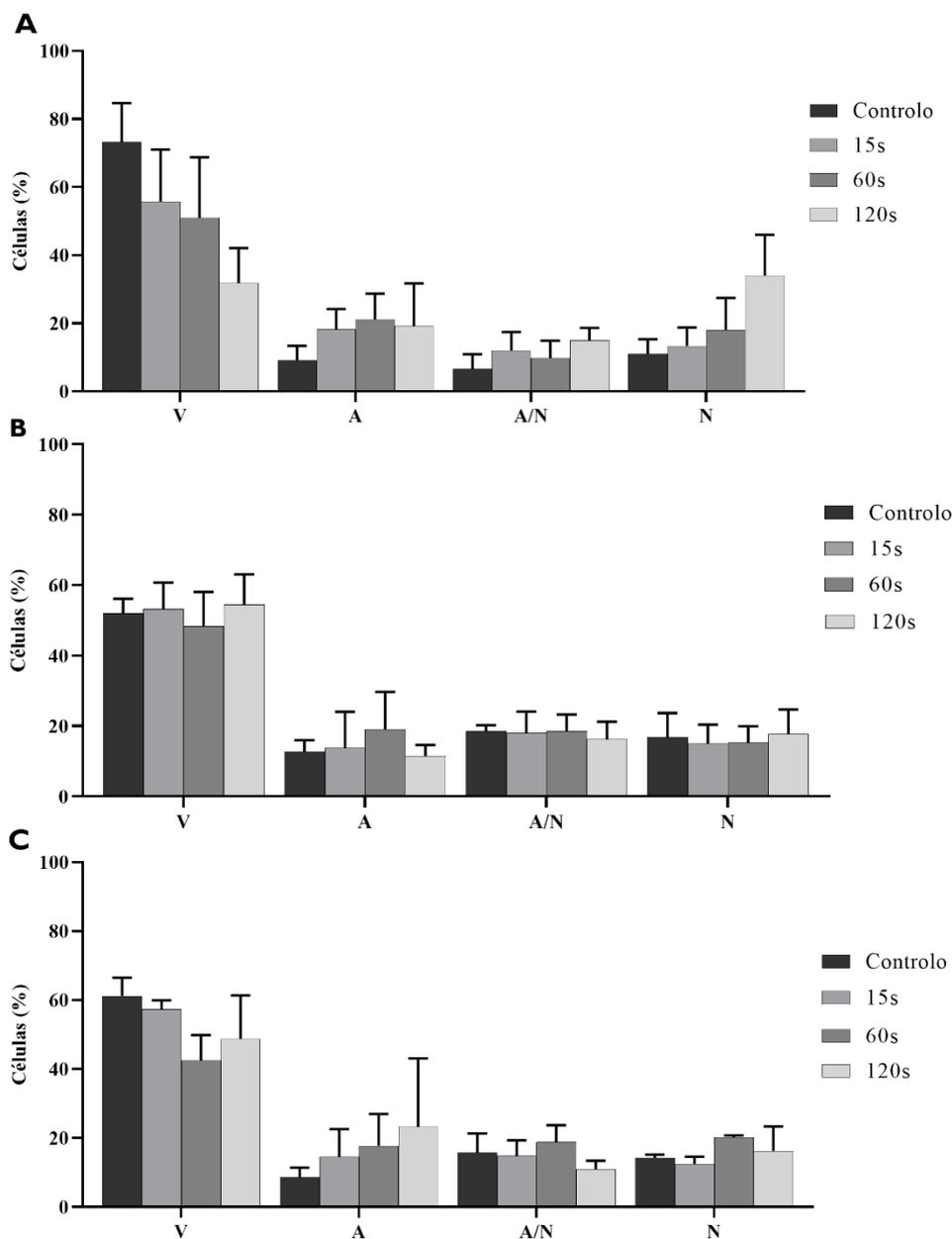


Figura 16 - Viabilidade celular após exposição ao tratamento com PFA. O PFA tende a diminuir a viabilidade das linhas celulares HuH7 (a), HepG2 (b) e Hep3B (c), de forma dependente do tempo de exposição ao tratamento. A viabilidade e o perfil de morte celular foram avaliados através do ensaio de citometria de fluxo, 48 horas após tratamento com PFA. Os resultados preliminares estão expressos como a média±desvio padrão, da porcentagem de células viáveis (V), células em apoptose inicial (A), células em apoptose/necrose (A/N) e células em necrose (N) (n≥2 experiências independentes em duplicado).

De um modo geral, verificou-se uma tendência para a diminuição do número de células viáveis com o aumento do tempo de exposição ao PFA. Essa tendência de diminuição da viabilidade celular foi acompanhada por uma tendência do aumento da população celular em morte celular, podendo ocorrer principalmente por apoptose e por necrose (Figura 16).

Considerando os resultados obtidos na linha celular HuH7 (Figura 16A), foi possível observar uma tendência para uma diminuição da viabilidade celular em relação ao controle para todos os tempos de exposição, sendo que após 15s de exposição ao tratamento, a percentagem de células vivas foi de $55,75 \pm 15,28\%$, após 60s foi de $51,00 \pm 17,9\%$ e após 120s foi de $31,83 \pm 10,30\%$, comparativamente ao controle, onde se observou uma percentagem de $73,25 \pm 11,44\%$. No que respeita aos 15s após exposição ao tratamento, foi possível verificar que a morte celular que tende a predominar foi a morte por apoptose inicial ($18,13 \pm 6,03\%$). Relativamente aos 60 após exposição, esta tendência continuou a verificar-se, por um aumento de células em apoptose inicial ($21,17 \pm 7,52\%$). Para além disso, também a percentagem de células em apoptose tardia/necrose ($9,83 \pm 5,04\%$) e necrose ($18,0 \pm 9,47\%$) tende a aumentar comparativamente ao controle, onde se observou uma percentagem de $9,13 \pm 4,26\%$ de células em apoptose inicial, $6,50 \pm 4,44\%$ de células em apoptose tardia/necrose e $11,13 \pm 4,16\%$ de células em necrose. Quanto aos 120s de exposição ao tratamento, de uma maneira geral, observa-se um aumento de células em morte celular comparativamente ao controle, no entanto o tipo de morte mais predominante foi a morte por necrose ($34,0 \pm 12,00\%$).

De uma maneira geral é possível verificar uma tendência para um aumento de células em apoptose para tempos de exposição mais curtos e um maior aumento de células em necrose para tempos de exposição mais elevados.

Relativamente aos resultados obtidos na linha celular HepG2 (Figura 16B), foi possível observar uma tendência para a inexistência de alterações na viabilidade celular após o tratamento com PFA, comparativamente ao controle, considerando todos os tempos de exposição. De forma similar, as populações de células em morte por apoptose inicial, por apoptose tardia/necrose e por necrose tendem a apresentar percentagens de células semelhantes para os diferentes tempos de exposição ao plasma e para o controle. Assim, após exposição de 15s ao plasma, a percentagem de células vivas foi de $53,25 \pm 7,46\%$, para os 60s foi de $48,00 \pm 9,84\%$ e para os 120s foi de $54,5 \pm 8,54\%$, comparativamente de uma percentagem de $52,00 \pm 4,16\%$ no controle. A percentagem de células em morte celular por apoptose inicial foi de $13,75 \pm 10,24\%$ após exposição de 15s, de $19,00 \pm 10,68\%$ após exposição de 60s e de $11,50 \pm 3,11\%$ após exposição de 120s, comparativamente a uma percentagem de $12,75 \pm 3,20\%$. De forma similar, após exposição de 15s ao plasma, observou-se uma percentagem de células em morte celular por apoptose tardia/necrose de $18,00 \pm 6,06\%$, de $18,50 \pm 4,73\%$ após 60s de exposição ao PFA e de $16,25 \pm 4,99\%$ após a exposição de 120s, comparativamente de uma percentagem de $18,50 \pm 1,73\%$ no controle. Relativamente à população de células em morte celular por necrose, verificou-se uma percentagem de $15,00 \pm 5,35\%$ após exposição de 15s, de

15,25±4,65% após exposição ao PFA de 60s e de 17,75±6,95%, comparativamente a uma percentagem de 16,75±6,95%.

Por último, na linha celular Hep3B (Figura 16C), foi possível observar uma tendência para uma diminuição da viabilidade celular em relação ao controlo para todos os tempos de exposição, sendo que para os 15s de exposição ao tratamento, a percentagem de células vivas foi de 55,25±2,63%, para os 60s foi de 42,50±7,33% e para os 120s foi de 48,75±12,61%, comparativamente a uma percentagem de células vivas de 61,17±6,01% no controlo. No que respeita aos 15s após exposição ao tratamento, foi possível verificar que não existiu um tipo de morte predominante, verificando-se células em apoptose inicial (15,83±9,81%), apoptose tardia/necrose (14,50±5,68%) e necrose (12,00±3,10%). Relativamente aos 60s após exposição, esta tendência continua a verificar-se, uma vez que a percentagem de células nos diferentes tipos de morte celular é muito semelhante. Para além disso, também a percentagem de células em apoptose inicial (17,75±9,18%), apoptose tardia/necrose (18,75±4,92%) e necrose (20,25±0,50%) tendeu a aumentar comparativamente ao controlo (8,83±2,79%, 15,67±5,16% e 14,33±2,94%, respetivamente). Quanto aos 120s de exposição ao tratamento, de uma maneira geral, observou-se uma tendência para o aumento de células em morte celular comparativamente ao controlo, no entanto o tipo de morte predominante foi a morte por apoptose inicial (23,25±19,84%).

Contrariamente ao observado para as linhas celulares anteriores, foi possível verificar, nesta linha celular, uma tendência para um aumento de células em apoptose inicial para tempos de exposição mais longos.

De forma geral, as linhas celulares em estudo mostraram ser sensíveis ao tratamento com PFA, com exceção da linha HepG2 que não sofreu alterações significativas de viabilidade celular (Figura 16).

4.3. Análise morfológica

De forma a complementar os resultados preliminares obtidos na avaliação da viabilidade e tipos de morte celular, foi realizada a análise das alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com plasma frio atmosférico, 48 horas após exposição a 15s, 60s e 120s. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 17, 18 e 19, sendo apresentadas três imagens representativas por condição.

A Figura 17 apresenta as imagens representativas dos resultados obtidos na linha celular HuH7.

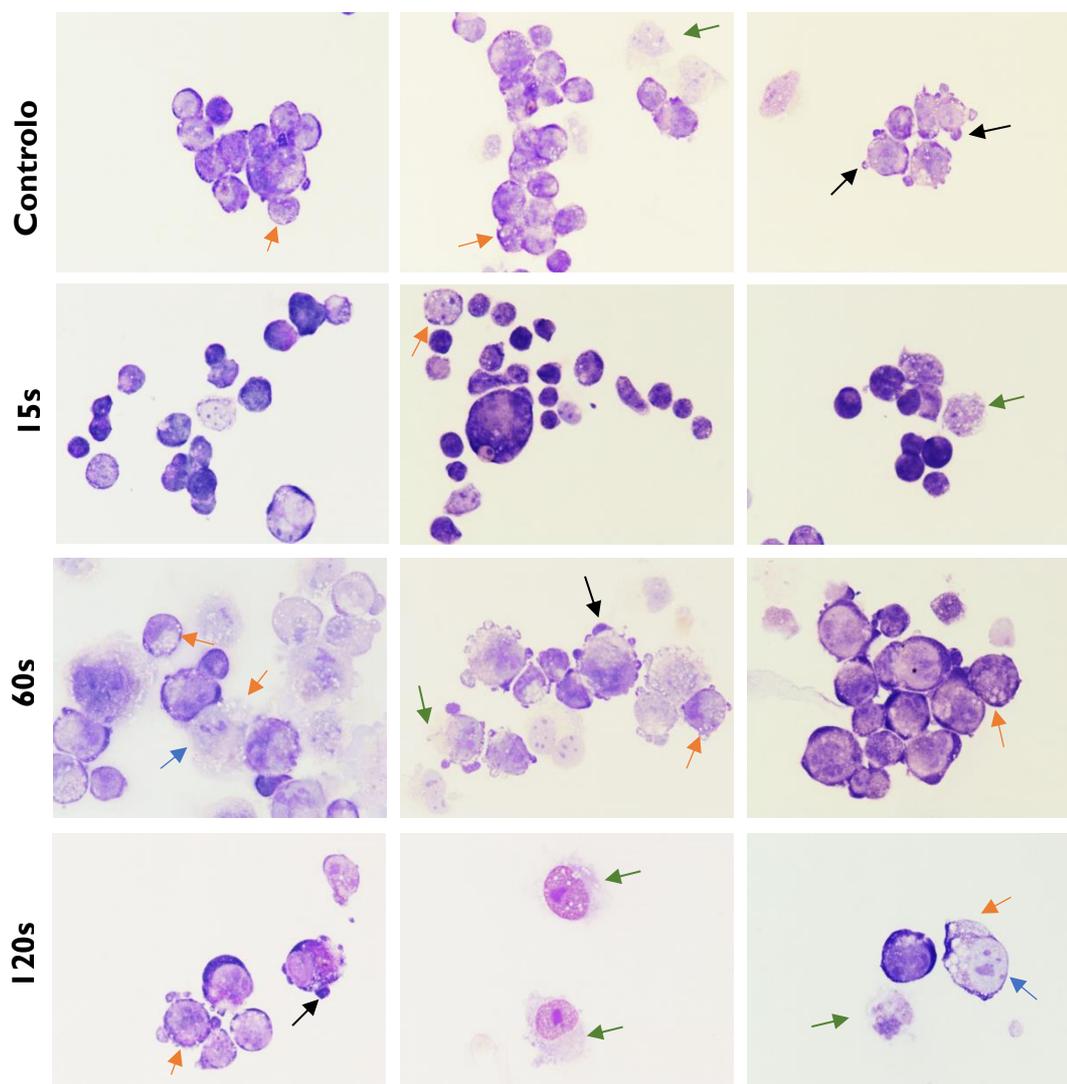


Figura 17 - Análise morfológica da linha celular HuH7. As imagens representativas foram obtidas após coloração com *May-Grünwald-Giemsa* e ilustram os resultados obtidos 48 horas após incubação de células não irradiadas (controle) e de células irradiadas durante 15, 60 e 120 segundos. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 50x. As setas pretas correspondem a *blebbings*, as laranja a vacuolização citoplasmática, as verdes ao extravasamento do citoplasma e as azuis correspondem a fragmentação nuclear.

Através da análise das imagens obtidas, foi possível verificar que nos controles, as células são na sua maioria células viáveis. Ainda assim, foi possível observar células em apoptose, pela presença de protuberâncias na membrana plasmática denominadas de *blebs* e vacuolização citoplasmática, e células em necrose, caracterizadas por extravasamento do citoplasma (Figura 17). Após 15s de exposição ao tratamento com PFA não se verificam diferenças significativas relativamente ao controle. No entanto, após 60s de exposição ao PFA foi possível observar um aumento de células em apoptose relativamente às condições

anteriores. Adicionalmente, células com extravasamento do citoplasma, em morte por necrose, também foram observadas para este tempo de exposição. Por fim, relativamente ao maior tempo de exposição, de 120s, verificou-se uma grande quantidade de células com alterações morfológicas características de morte celular por apoptose e necrose (Figura 17). Em concordância com os resultados obtidos na citometria, foi possível verificar que para a linha celular HuH7 tempos de exposição menores, induzem morte celular por apoptose e tempos maiores induzem morte celular por necrose.

A Figura 18 apresenta as imagens representativas dos resultados obtidos na linha celular HepG2.

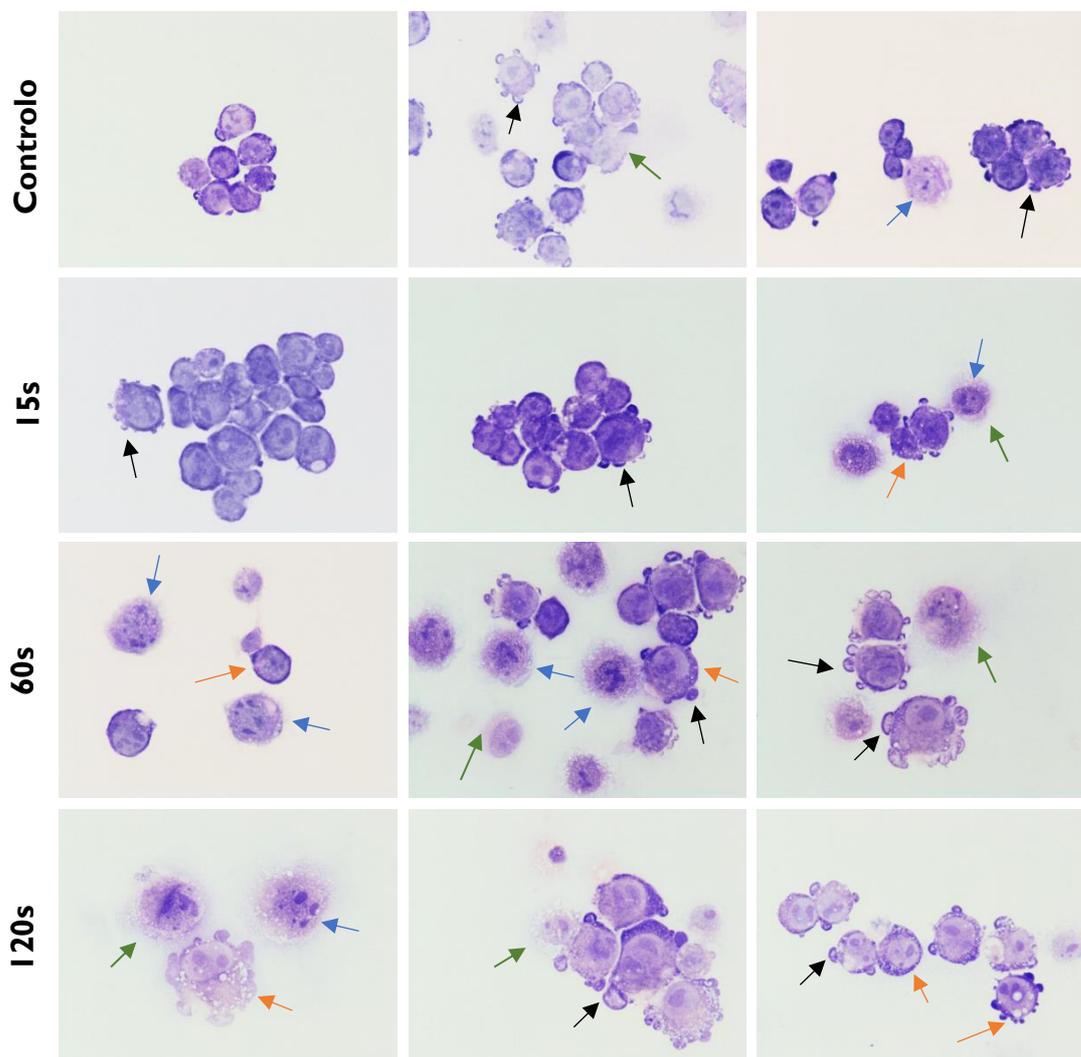


Figura 18 - Análise morfológica da linha celular HepG2. As imagens representativas foram obtidas após coloração com *May-Grünwald-Giemsa* e ilustram os resultados obtidos 48 horas após incubação de células não irradiadas (controlo) e de células irradiadas durante 15, 60 e 120 segundos. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 50x. As setas pretas correspondem a *blebbings*, as laranjas a vacuolização citoplasmática, as verdes ao extravasamento do citoplasma e as azuis correspondem a fragmentação nuclear.

Nesta linha celular, a análise das imagens representativas do controlo permite verificar a presença de um número considerável de células em morte celular por apoptose,

evidenciadas pela formação de *blebs* e fragmentação nuclear (Figura 18). Este facto está em concordância com o verificado na análise da viabilidade e tipos de morte celular por citometria de fluxo, onde foi igualmente verificada uma viabilidade celular relativamente baixa nesta condição. Considerando a análise das imagens representativas para as condições de tratamento, foi possível observar, para o tempo de exposição ao PFA de 15s, que as células se apresentavam viáveis na sua maioria, no entanto, também foi possível observar a presença de células em morte celular por apoptose e por necrose, pela presença de *blebs* e fragmentação nuclear, bem como pela presença de extravasamento do citoplasma, respetivamente. Por fim, para os maiores tempos de exposição, de 60 e 120s, foi possível observar predominantemente células em apoptose, embora algumas células, em menor número, apresentassem características morfológicas características de morte celular por necrose.

A Figura 19 apresenta as imagens representativas dos resultados obtidos na linha celular Hep3B.

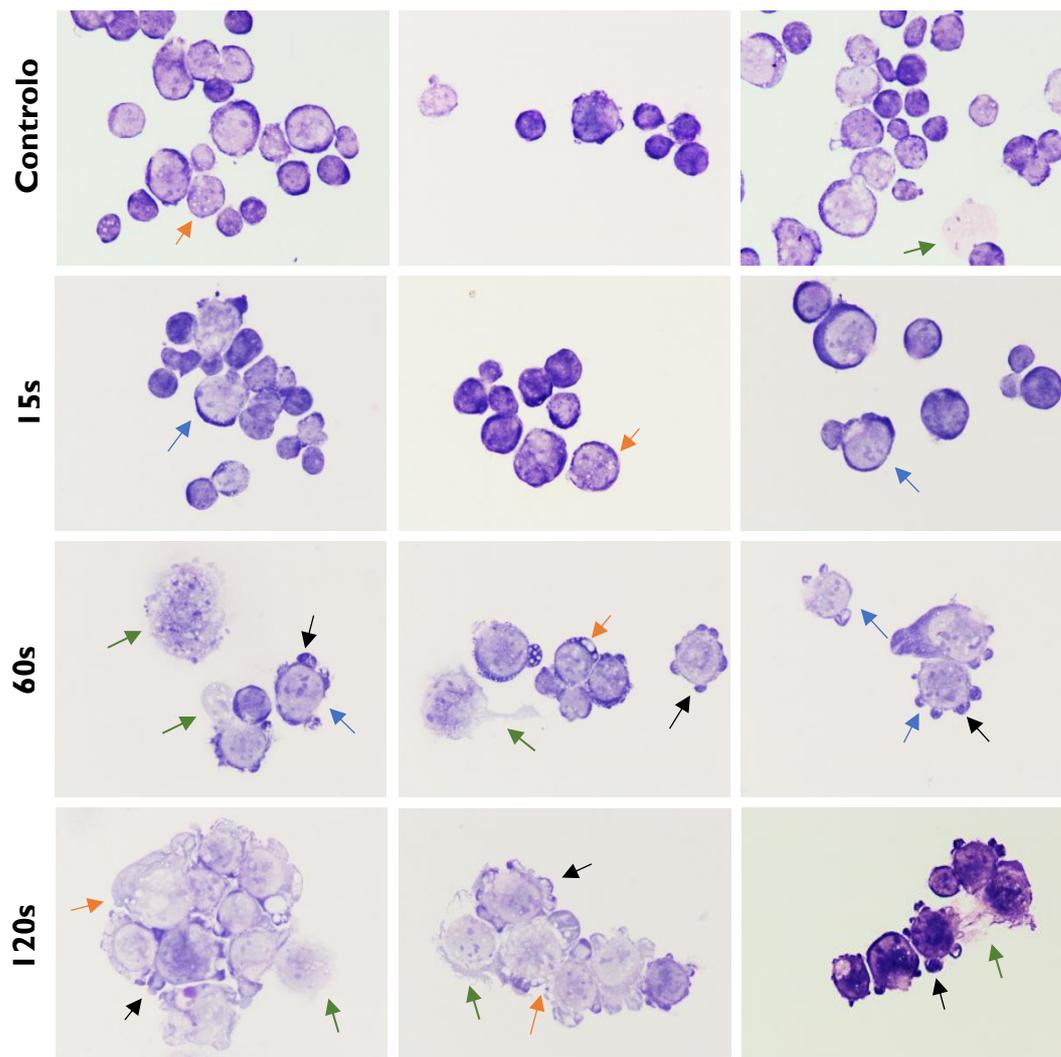


Figura 19 - Análise morfológica da linha celular Hep3B. As imagens representativas foram obtidas após coloração com *May-Grünwald-Giemsa* e ilustram os resultados obtidos 48 horas após incubação de células não irradiadas (controlo) e de células irradiadas durante 15, 60 e 120 segundos. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 50x. As setas pretas correspondem a *blebbings*, as laranja a vacuolização citoplasmática, as verdes ao extravasamento do citoplasma e as azuis correspondem a fragmentação nuclear.

De acordo com a análise das imagens obtidas para esta linha celular, é possível observar que no controlo, as células observadas se encontram maioritariamente viáveis (Figura 19).

Verificou-se também que, após 15s de exposição ao tratamento com PFA, não se verificam diferenças significativas relativamente ao às imagens obtidas para o controlo. No que respeita à análise das imagens obtidas após o tratamento com 60s de exposição, foi possível observar um aumento de células em apoptose, caracterizadas pela formação de *blebs*, fragmentação nuclear e vacuolização, relativamente às condições anteriores. Foram igualmente observadas algumas células em necrose, com extravasamento do citoplasma. Por fim, relativamente ao tempo de exposição de 120s, foi possível verificar um grande número de células em morte celular por apoptose e por necrose (Figura 19).

Em concordância com os resultados obtidos por citometria de fluxo, foi possível verificar que para a linha celular Hep3B tempos de exposição mais curtos induziram morte celular por apoptose e que os tempos de exposição ao PFA induziram morte celular por necrose.

4.4. Ciclo celular

Na Figura 20 estão representados os resultados preliminares das alterações no ciclo celular das linhas celulares HuH7 (Figura 20A), HepG2 (Figura 20B) e Hep3B (Figura 20C), após exposição ao plasma frio atmosférico durante 15, 60 e 120 segundos. Os resultados estão expressos em percentagem de células para cada uma das fases do ciclo: pré- G_0/G_1 , G_0/G_1 , S e G_2/M .

De um modo geral, verificou-se uma diminuição de células em fase G_0/G_1 e um aumento de células em fase G_2/M , com o aumento do tempo de exposição ao tratamento com PFA (Figura 20).

Considerando os resultados obtidos na linha celular HuH7 (Figura 20A), foi possível observar uma tendência para uma diminuição da percentagem de células em fase G_0/G_1 , comparativamente ao controlo, para todos os tempos de exposição. Desta forma, para o tempo de exposição de 15s, a percentagem de células em G_0/G_1 foi de $52,11 \pm 7,04\%$, após exposição de 60s foi de $42,17 \pm 6,85\%$ e após exposição de 120s foi de $29 \pm 10,25\%$, comparativamente a uma percentagem de $60,56 \pm 3,78\%$. No que respeita ao tratamento com exposição de 15s, foi ainda possível verificar uma tendência para um aumento do número de células em fase S ($33,44 \pm 9,85\%$) e fase G_2/M ($14,44 \pm 6,15\%$) comparativamente ao controlo ($26,78 \pm 4,6\%$ e $12,67 \pm 2,92\%$, respetivamente). Considerando os resultados após exposição ao PFA de 60s identificaram-se $32,67 \pm 7,37\%$ de células em fase S e $25,17 \pm 6,11\%$ de células em G_2/M . Após 120s de exposição ao tratamento, é possível observar-se uma tendência para aumento de células em fase G_2/M ($48,60 \pm 17,10\%$), comparativamente ao controlo e a tempos de exposição mais curtos. No que respeita às células em pré- G_0/G_1 , o denominado pico apoptótico, verificou-se uma tendência para um aumento da percentagem destas células com o aumento do tempo de exposição à terapia.

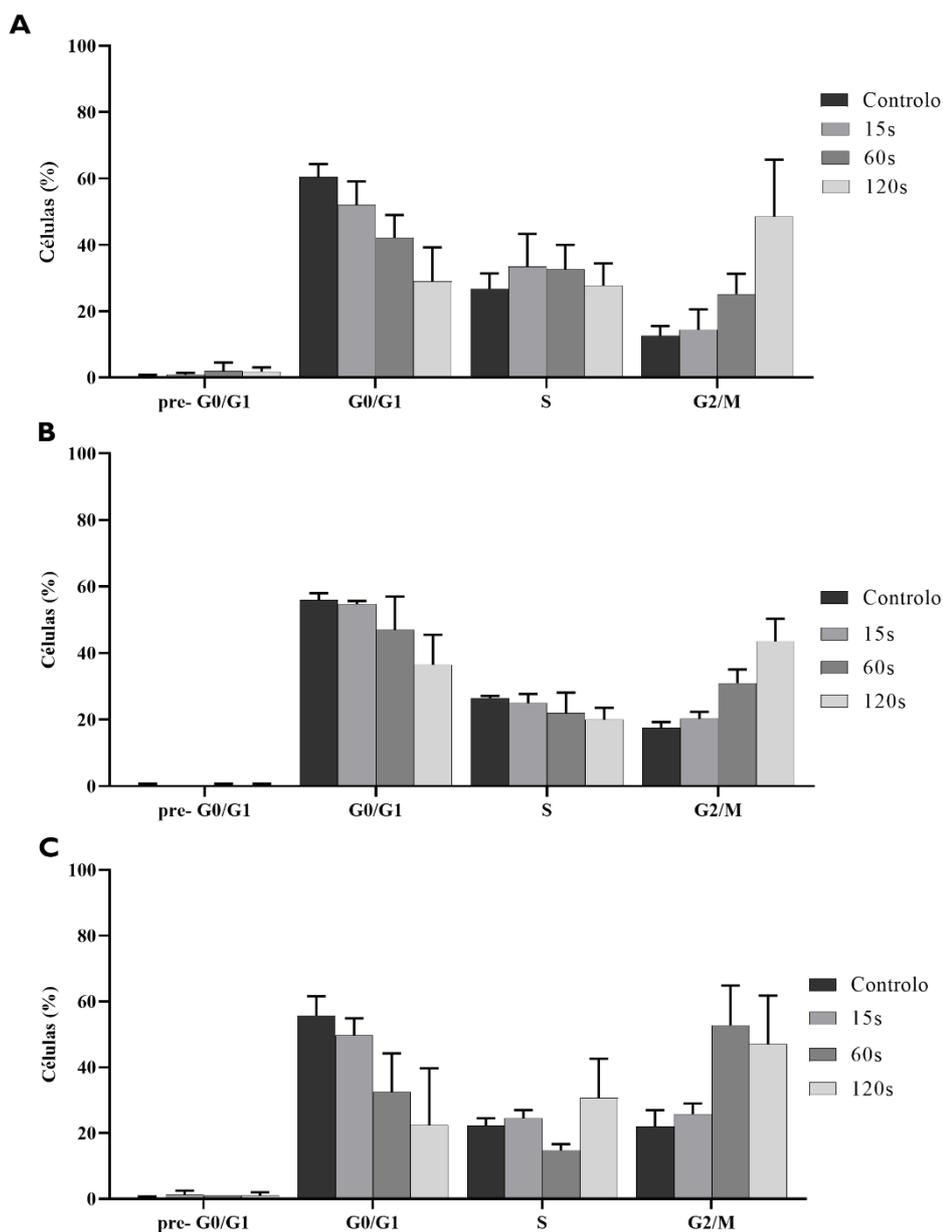


Figura 20 - Alterações no ciclo celular após exposição ao tratamento com PFA. O PFA tende a induzir alterações no ciclo celular das linhas celulares HuH7 (a), HepG2 (b) e Hep3B (c), de forma dependente do tempo de exposição ao tratamento. A progressão do ciclo celular foi avaliada através do ensaio de citometria de fluxo, 48 horas após tratamento com PFA. Os resultados preliminares estão expressos como a média±desvio padrão, da percentagem de células identificadas em cada fase: pré-G₀/G₁, G₀/G₁, S e G₂/M. (n≥2 experiências independentes em duplicado).

Relativamente aos resultados obtidos na linha celular HepG2 (Figura 20B), foi possível observar uma tendência para uma diminuição da percentagem de células em fase G₀/G₁, comparativamente ao controlo para todos os tempos de exposição, sendo que após exposição ao PFA de 15s, a percentagem de células foi nesta fase do ciclo celular foi de 54,75±0,96%, após exposição de 60s foi de 47,0±10,0% e após exposição de 120s foi de 36,50±9,0%, comparativamente a uma percentagem de 56,00±2,00% no controlo. No que respeita à

exposição ao tratamento de 15s, foi ainda possível verificar uma tendência para a diminuição da percentagem de células em fase S ($20,25 \pm 2,06\%$) e uma tendência para o aumento da percentagem de células em fase G₂/M ($14,44 \pm 6,15\%$) comparativamente ao controlo ($26,50 \pm 0,58\%$ e $17,50 \pm 1,73\%$, respetivamente). Relativamente ao tratamento com exposição de 60s esta tendência continua a verificar-se ($22,00 \pm 6,06\%$ de células em fase S e $31,00 \pm 4,08\%$ de células em G₂/M). Quanto aos resultados obtidos após uma exposição ao PFA de 120s, foi possível observar uma tendência para aumento de células em fase G₂/M ($43,50 \pm 6,76\%$), comparativamente ao controlo e comparativamente a tempos de exposição mais curtos. No que respeita às células em pré-G₀/G₁, verificou-se que a exposição ao PFA tende a não induzir alterações na percentagem de células identificadas no pico apoptótico.

No que concerne aos resultados obtidos para linha celular Hep3B (Figura 20C), foi possível observar uma tendência para uma diminuição da percentagem de células na fase G₀/G₁, comparativamente ao controlo para todos os tempos de exposição. Desta forma, após exposição ao PFA de 15s, a percentagem de células nesta fase do ciclo foi de $49,75 \pm 5,12\%$, após exposição de 60s foi de $32,50 \pm 11,73\%$ e após exposição de 120s foi de $22,33 \pm 17,39\%$, comparativamente a uma percentagem de $55,75 \pm 5,85\%$ no controlo. No que respeita aos 15s após exposição ao tratamento, foi ainda possível verificar que tende a existir um aumento de células em fase S ($24,50 \pm 2,52\%$) e em fase G₂/M ($25,75 \pm 3,20\%$) comparativamente ao controlo ($22,25 \pm 2,22\%$ e $22,00 \pm 4,97\%$, respetivamente). Relativamente ao tratamento com exposição ao PFA de 60s, verificou-se uma tendência para o aumento da percentagem de células em fase G₂/M ($52,75 \pm 12,15\%$). Além disso, verificou-se uma tendência para o decréscimo da percentagem de células em fase S ($14,75 \pm 1,89\%$). Quanto aos resultados obtidos após exposição ao PFA durante 120s, foi possível observar-se uma tendência para o aumento de células em fase G₂/M ($47,00 \pm 14,80\%$) comparativamente ao controlo. No que respeita às células em fase pré-G₀/G₁, verificou-se, tal como na linha celular HepG2 que a exposição ao PFA tende a não induzir alterações na percentagem de células identificadas no pico apoptótico.

De forma geral, os resultados preliminares relativos às alterações no ciclo celular induzidas pelo tratamento com PFA, mostraram uma tendência para um bloqueio das células nas fases S e G₂/M, dependente dos tempos de exposição ao PFA (Figura 20).

4.5. Potencial de membrana mitocondrial

Para compreender a influência do tratamento com PFA na função mitocondrial das linhas celulares em estudo, foram avaliados os seus efeitos no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), por citometria de fluxo, com recurso à sonda JC-1, 48 horas após tratamento. Os tempos de exposição aos quais as células foram expostas foram de 15, 60 e 120 segundos. Na Figura 21 estão representados os resultados preliminares obtidos para ambas as linhas celulares, representados sob a forma da razão monómeros/agregados (M/A), normalizada ao controlo.

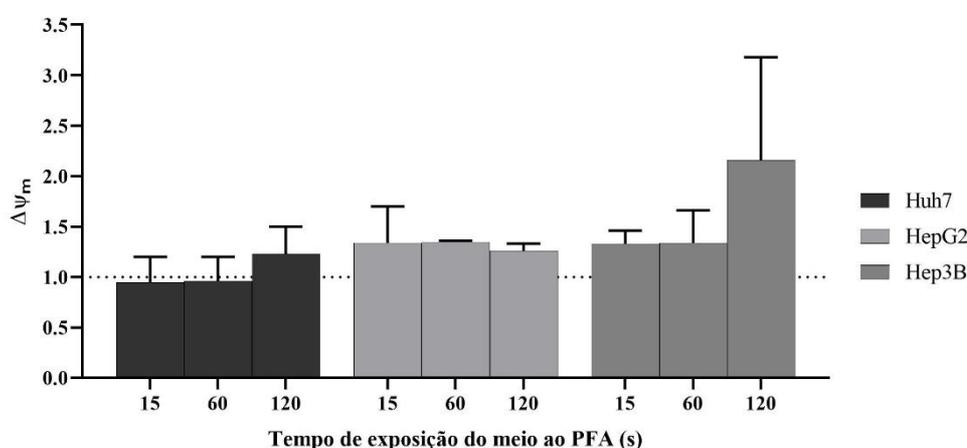


Figura 21 - Potencial de membrana mitocondrial após exposição ao tratamento com PFA. O PFA tende a induzir despolarização da membrana mitocondrial das linhas celulares HuH7 (a), HepG2 (b) e Hep3B (c), de forma dependente do tempo de exposição ao tratamento. O potencial da membrana mitocondrial foi avaliado através do ensaio de citometria de fluxo, 48 horas após tratamento com PFA. Os resultados preliminares estão expressos como a média ± desvio padrão, da razão monómeros/ agregados (M/A) normalizada ao controlo ($n \geq 2$ experiências independentes em duplicado).

De acordo com o gráfico correspondente à linha celular Huh7 (Figura 21), foi possível verificar uma tendência para o aumento do potencial de membrana mitocondrial aos 120s ($1,23 \pm 0,27$) comparativamente ao controlo, o que pode ser indicativo de disfunção mitocondrial. Desta forma foi possível verificar que o maior grau de disfunção da membrana tende a ocorrer para o maior tempo de exposição ao tratamento.

Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular HepG2 (Figura 21), foi possível verificar uma tendência para um aumento do potencial de membrana mitocondrial para todos os tempos de exposição à terapia, comparativamente ao controlo. Desta forma, verificou-se uma tendência para o aumento da razão M/A após exposição ao PFA de 15s ($1,34 \pm 0,36$), após exposição de 60s ($1,35 \pm 0,01$) e após exposição de 120s ($1,26 \pm 0,07$). Assim,

tal como na linha celular HuH7, foi possível verificar que esta tendência para a alteração no potencial de membrana mitocondrial poderá indicar disfunção mitocondrial e consequentemente, induzir morte celular.

Por fim, considerando os resultados obtidos para a linha celular Hep3B (Figura 21), foi possível verificar que para todos os tempos de exposição à terapia, tende a ocorrer um aumento da razão M/A em relação ao controlo, sendo que após exposição ao PFA de 15s esta razão foi de $1,33 \pm 0,13$, após exposição de 60s foi de $1,34 \pm 0,32$ e após exposição de 120s foi de $2,16 \pm 1,02$. Estes dados parecem indicar que o aumento do tempo de exposição ao tratamento com PFA poderá induzir uma maior despolarização do potencial de membrana mitocondrial.

4.6. Espécies reativas de oxigénio

De forma a avaliar a produção de espécies reativas de oxigénio induzida pelo PFA, nas três linhas celulares de carcinoma hepatocelular, foram avaliados o conteúdo intracelular de peróxidos e o conteúdo intracelular do radical superóxido, 2, 6 e 24 horas após exposição ao tratamento. O conteúdo intracelular de peróxidos foi avaliado com recurso à sonda DCFH₂-DA e o conteúdo intracelular do radical superóxido foi avaliado com recurso à sonda DHE. Para ambos os ensaios, utilizaram-se os tempos de exposição ao plasma frio atmosférico de 15, 60 e 120 segundos.

4.6.1. Conteúdo intracelular de peróxidos

Na Figura 22 estão representados os resultados do conteúdo intracelular de peróxidos das linhas celulares HuH7 (Figura 22A), HepG2 (Figura 22B) e Hep3B (Figura 22C), após exposição ao plasma frio durante 15, 60 e 120s. Os resultados são expressos pela média das intensidades de fluorescência, normalizada ao controlo.

Considerando os resultados obtidos na linha celular HuH7 (Figura 22A), 2 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo

intracelular de peróxidos após exposição ao PFA de 15s ($0,86 \pm 0,11$, $p=0,018$), de 60s ($0,80 \pm 0,16$, $p=0,043$) e de 120s ($0,71 \pm 0,22$, $p=0,028$), comparativamente ao controle.

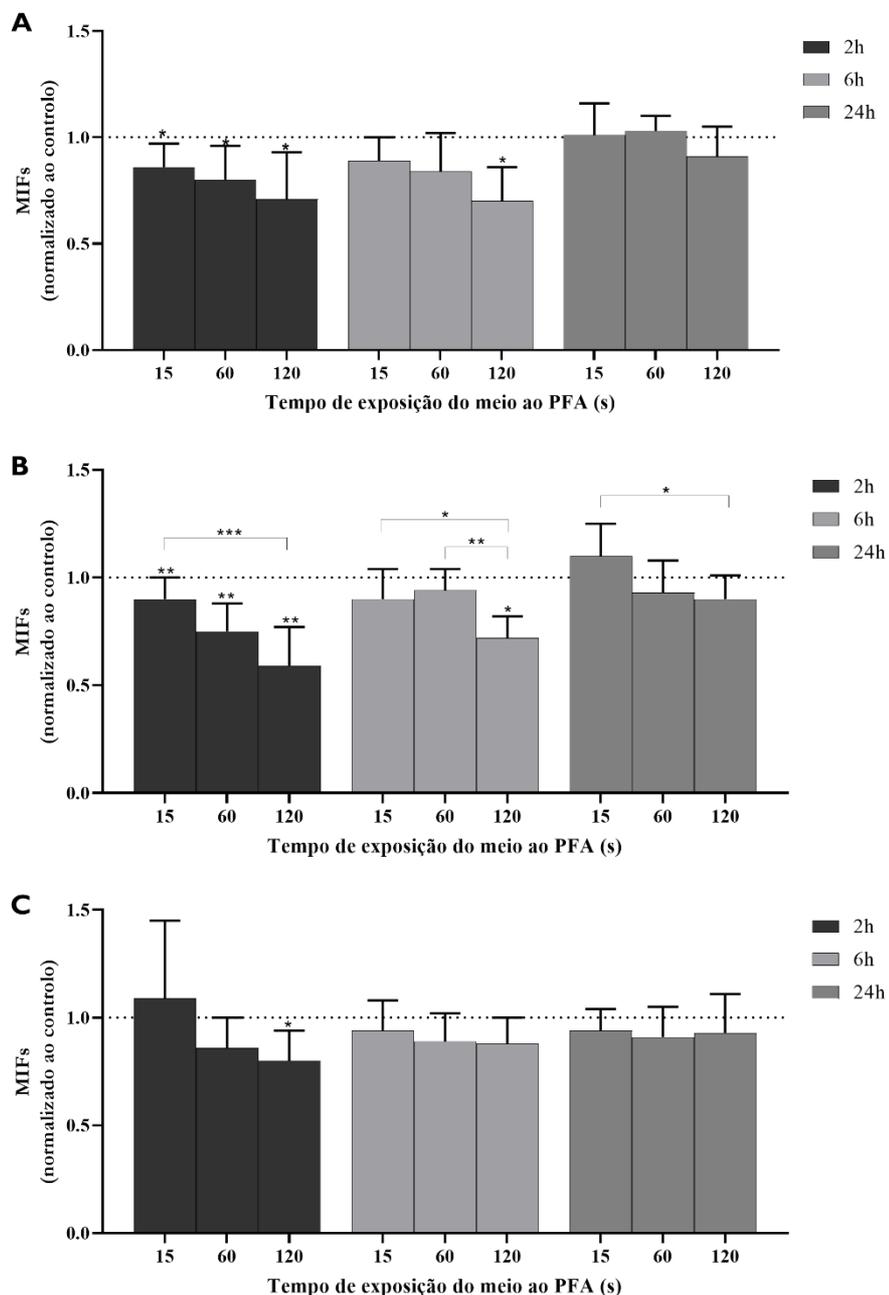


Figura 22 - Conteúdo intracelular de peróxidos após exposição ao tratamento com PFA. O PFA diminuiu o conteúdo intracelular de peróxidos das linhas celulares HuH7 (a), HepG2 (b) e Hep3B (c), de forma dependente do tempo de exposição e incubação após o tratamento. O conteúdo intracelular de peróxidos foi avaliado por fluorescência 2, 6 e 24 horas após tratamento com PFA, utilizando a sonda DCFH₂-DA. Os resultados estão expressos como a média±desvio padrão, da média das intensidades de fluorescência (MIFs) normalizada ao controle (n≥3 experiências independentes em triplicado). Os * representam as diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição, sendo que * significa $p<0,05$, ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$.

Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar uma tendência para que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos (Figura 22A).

Relativamente aos resultados obtidos 6 horas após o tratamento (Figura 22A), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo intracelular de peróxidos após exposição de 120s ($0,70 \pm 0,16$, $p=0,027$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição tende a induzir a um maior decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos (Figura 22A).

No que respeita aos resultados obtidos 24 horas após o tratamento, foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico não induziu alterações significativas no conteúdo intracelular de peróxidos após exposição ao PFA comparativamente ao controlo. Contudo, poderá verificar-se uma tendência para uma diminuição desta espécie para o maior tempo de exposição ao PFA.

Neste estudo, analisou-se também se o tempo decorrido após a exposição ao tratamento com PFA poderia influenciar os efeitos induzidos no conteúdo intracelular de peróxidos. Nesse sentido, de forma geral, foi possível observar que a diminuição do conteúdo intracelular de peróxidos foi mais evidente para o menor tempo após a exposição ao PFA. Assim, verificou-se que após exposição ao PFA de 15s, o decréscimo do nível intracelular de peróxidos foi significativamente superior às 2h comparativamente às 24h ($p=0,043$).

Considerando os resultados obtidos na linha celular HepG2 (Figura 22B), 2 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo intracelular de peróxidos após exposição ao PFA de 15s ($0,90 \pm 0,10$, $p=0,007$), de 60s ($0,75 \pm 0,13$, $p=0,008$) e de 120s ($0,59 \pm 0,18$, $p=0,008$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição leva a um maior decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos, tal como representado graficamente na Figura 22B. Desta forma, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA de 120s induziu um decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos significativamente superior comparativamente a uma exposição de 15s ($p<0,001$).

Relativamente aos resultados obtidos 6 horas após o tratamento (Figura 22B), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico induziu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo intracelular de peróxidos após exposição de 120s ($0,70 \pm 0,16$, $p=0,012$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada

tempo de exposição, foi possível observar que o aumento do tempo de exposição leva a um maior decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos, tal como representado na Figura 22B. Assim, verificou-se que a exposição de 120s ao PFA induziu um decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos significativamente superior, comparativamente a uma exposição de 15s ($p=0,010$) e de 60s ($p=0,003$).

No que diz respeito aos resultados obtidos 24 horas após o tratamento, não se verificaram alterações significativas no conteúdo intracelular de peróxidos após exposição ao PFA comparativamente ao controlo. Contudo, comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo intracelular peróxidos, tal como representado graficamente na Figura 22B. Assim, observou-se que após exposição de 120s ao tratamento com PFA, induziu um decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos significativamente superior, comparativamente a uma exposição de 15s ($p=0,028$).

Neste estudo, analisou-se também se os efeitos induzidos no conteúdo intracelular de peróxidos após a exposição ao PFA dependeriam do tempo decorrido após o tratamento. Nesse sentido, de forma geral, foi possível observar que o decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos foi mais pronunciado às 2h comparativamente às 6h e 24h. Desta forma, o decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos após exposição de 15s foi significativamente superior às 2h comparativamente às 6h ($p=0,017$) e às 24h ($p=0,011$). No que toca a uma exposição de 60s, foi observado um decréscimo significativo do conteúdo intracelular de peróxidos às 2h comparativamente às 24h ($p=0,019$). Adicionalmente também se verificou esta diminuição significativa entre as 6 e as 2h ($p=0,018$). Por fim, após exposição de 120s, observou-se um conteúdo intracelular de peróxidos às 24h significativamente superior ao observado às 2h ($p<0,001$) e às 6h ($p=0,039$).

Relativamente aos resultados obtidos na linha celular Hep3B (Figura 22C), 2 horas após o tratamento, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo intracelular de peróxidos após exposição ao PFA de 120s ($0,80\pm 0,15$, $p=0,046$), comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição leva a um maior decréscimo do conteúdo intracelular peróxidos, tal como representado graficamente na Figura 22C. Desta forma, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA de 120s induziu um decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos significativamente superior comparativamente a uma exposição de 15s ($p<0,001$).

No que concerne aos resultados obtidos 6 e 24h horas após o tratamento (Figura 22C), não se observaram diferenças significativas no conteúdo de peróxidos intracelulares após o tratamento com plasma frio atmosférico.

Como referido anteriormente, neste estudo, analisou-se também se o tempo decorrido após a exposição ao tratamento com PFA poderia influenciar os efeitos induzidos no conteúdo intracelular de peróxidos. Nesse sentido, de forma geral, não se verificaram diferenças significativas do conteúdo intracelular de peróxidos com o aumento do tempo após exposição ao plasma frio atmosférico.

4.6.2. Conteúdo intracelular de radical superóxido

Na Figura 23 estão representados os resultados do conteúdo intracelular de radical superóxido das linhas celulares HuH7 (Figura 23A), HepG2 (Figura 23B) e Hep3B (Figura 23C), após exposição ao plasma frio durante 15, 60 e 120s. Os resultados são expressos pela média das intensidades de fluorescência normalizada ao controlo.

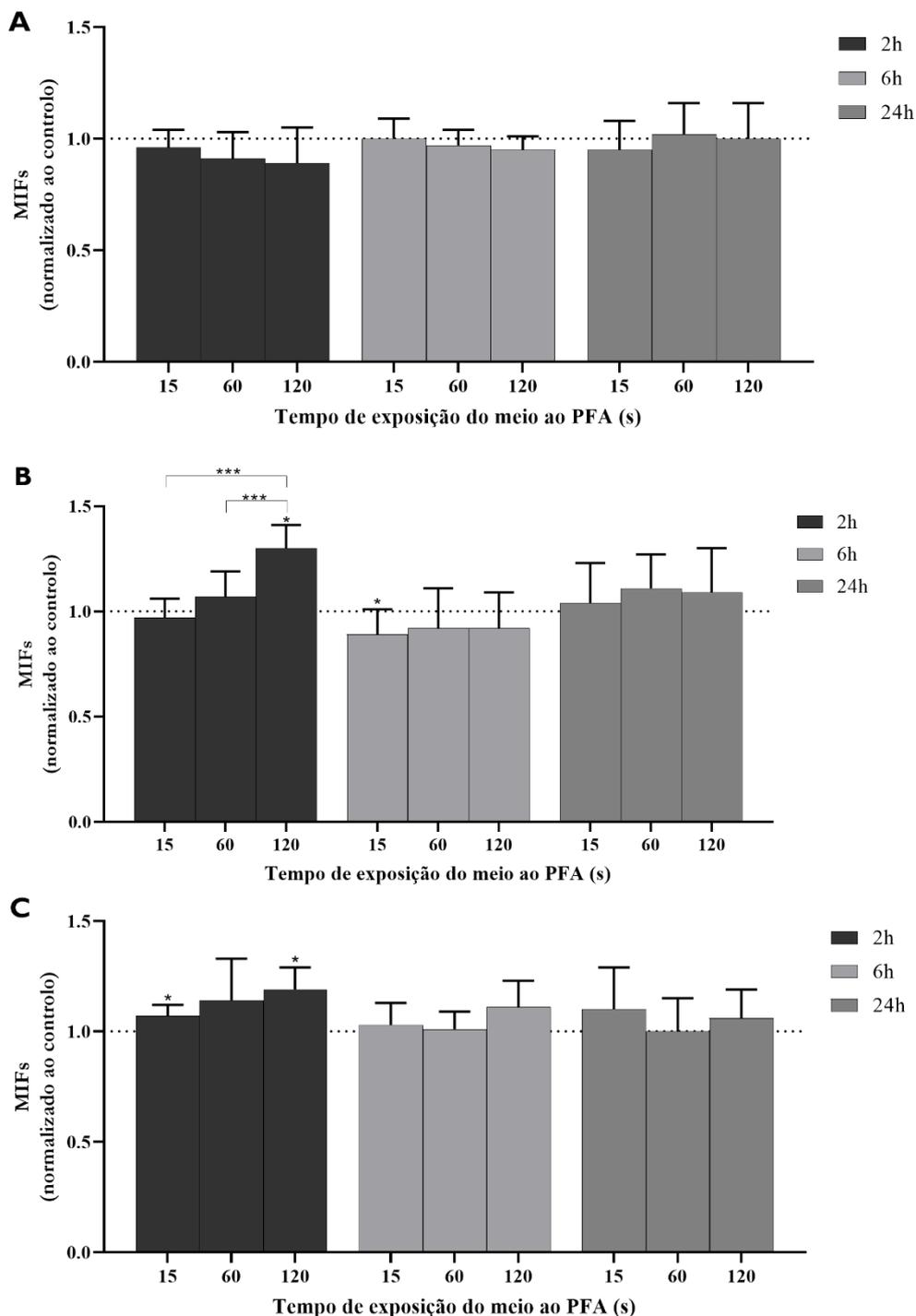


Figura 23 - Conteúdo intracelular de radical superóxido após exposição ao tratamento com PFA. O PFA levou a alterações no conteúdo intracelular de peróxidos das linhas celulares HuH7 (a), HepG2 (b) e Hep3B (c), de forma dependente do tempo de exposição e incubação após o tratamento. O conteúdo intracelular de radical superóxido foi avaliado por fluorescência 2, 6 e 24 horas após tratamento com PFA, utilizando a sonda DHE. Os resultados estão expressos como a média±desvio padrão, da média das intensidades de fluorescência (MIFs) normalizada ao controle (n≥3 experiências independentes em triplicado). Os * representam as diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de exposição, sendo que * significa p<0,05, ** significa p<0,01 e *** significa p<0,001.

Considerando os resultados obtidos na linha celular HuH7 (Figura 23A), 2 horas após o tratamento, foi possível verificar que o tratamento com plasma frio atmosférico não induziu alterações significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido em relação ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, foi possível igualmente verificar a ausência de alterações significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido.

Relativamente aos resultados obtidos 6 horas e 24 horas após o tratamento (Figura 23A), foi possível observar que o tratamento com plasma frio atmosférico não induziu alterações significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, também não se verificaram alterações significativas, tanto para as 6h como para as 24h após exposição ao PFA.

Considerando os diferentes tempos de avaliação após a exposição ao tratamento com PFA foi possível verificar que não se observaram alterações significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido entre os diferentes tempos de avaliação.

Considerando os resultados obtidos na linha celular HepG2 (Figura 23B), 2 horas após o tratamento, foi possível verificar um aumento estatisticamente significativo do conteúdo intracelular de radical superóxido após exposição ao PFA de 120s ($1,3 \pm 0,11$, $p=0,012$), comparativamente ao controlo. Através da comparação entre cada tempo de exposição, foi possível verificar que o aumento do tempo de exposição levou a um maior aumento do conteúdo intracelular de radical superóxido, tal como representado graficamente na Figura 23B. Assim, verificou-se que a exposição ao tratamento com PFA de 120s induziu um aumento do conteúdo intracelular de radical superóxido significativamente superior comparativamente a uma exposição de 15s ($p<0,001$) e de 60s ($p<0,001$).

Relativamente aos resultados obtidos 6 horas após o tratamento (Figura 23B), foi possível observar que o plasma frio atmosférico induziu uma diminuição estatisticamente significativa do conteúdo intracelular de radical superóxido após exposição de 15s ($0,89 \pm 0,12$, $p=0,036$), comparativamente ao controlo. Na análise dos valores obtidos para cada tempo de exposição, não foi possível observar diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição ao PFA.

No que diz respeito aos resultados obtidos 24 horas após o tratamento, não se verificaram alterações significativas do conteúdo intracelular de radical superóxido após exposição ao PFA comparativamente ao controlo, não existindo igualmente diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição ao PFA.

Considerando as diferenças observadas no conteúdo intracelular de radical superóxido nos diferentes tempos de avaliação após o tratamento com plasma frio atmosférico, foi possível verificar um decréscimo significativo do conteúdo intracelular de radical superóxido 2h após o tratamento após exposição de 120s comparativamente às 6h ($p=0,001$).

Relativamente aos resultados obtidos na linha celular Hep3B (Figura 23C), 2 horas após o tratamento, foi possível verificar um aumento estatisticamente significativo do conteúdo intracelular de radical superóxido após exposição ao PFA de 15s ($1,07\pm 0,05$, $p=0,046$) e 120s ($1,19\pm 0,10$, $p=0,012$) comparativamente ao controlo. Comparando os valores obtidos para cada tempo de exposição, não foi possível verificar alterações significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido, tal como representado graficamente na Figura 23C.

No que concerne aos resultados obtidos 6 e 24h horas após o tratamento (Figura 23C), não se verificaram diferenças significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido após o tratamento com plasma frio atmosférico. Considerando os resultados obtidos entre os diferentes tempos de exposição ao PFA, não foi igualmente possível observar alterações significativas.

Considerando o tempo decorrido após o tratamento com PFA, não foi possível observar diferenças significativas no conteúdo intracelular de radical superóxido entre os diferentes tempos de avaliação estudados.

Capítulo V

Discussão

O carcinoma hepatocelular representa um problema de importância global, uma vez que as suas taxas de incidência e mortalidade têm vindo a aumentar nas últimas décadas. Atualmente, a nível mundial, é já o sétimo tipo de cancro mais incidente e constitui a quarta causa de morte por cancro (GLOBOCAN 2020). No ano de 2040, estima-se que seja responsável por mais 60% dos casos e das mortes por cancro, a nível global (GLOBOCAN 2020). A grande similaridade entre as taxas de incidência deve-se ao facto desta neoplasia ser assintomática e, por isso, diagnosticada em fases tardias da doença, nas quais as opções terapêuticas são muito reduzidas. Das abordagens terapêuticas utilizadas, apenas a ressecção hepática e a transplantação oferecem hipóteses curativas. No entanto, os doentes, muitas vezes, não são elegíveis para estas terapias devido ao elevado grau de severidade do tumor e, por isso, opta-se por terapias que tendem a ter um carácter meramente paliativo (Semmler et al., 2020). Assim, surge a necessidade de investigar novos métodos de terapia para este tipo de tumor, capazes de melhorar o prognóstico dos doentes (Smolková et al., 2019).

O plasma frio atmosférico tornou-se alvo de interesse para o tratamento do cancro há cerca de 12 anos. Desde então, o seu efeito anti cancerígeno já foi demonstrado em vários tipos de cancros como o melanoma (Keidar et al., 2011; Lee et al., 2009; Mashayekh et al., 2015), o cancro da mama (Ferreira, 2019; Kim et al., 2010), o cancro colorretal (Kim et al., 2010; Vandamme et al., 2012), o cancro do pulmão (Kim et al., 2011), o cancro da bexiga (Pereira, 2020; Wang et al., 2021), o cancro do ovário (Utsumi et al., 2013), o cancro da cabeça e do pescoço (Guerrero-preston et al., 2014; Hasse et al., 2019), a leucemia (Barekzi e Laroussi, 2012), entre outros. Ainda assim, a compreensão do mecanismo subjacente a este efeito, é muito limitado (Yan, Sherman e Keidar, 2017). Até à data, vários estudos realizados têm demonstrado este potencial do plasma frio atmosférico na área da oncobiologia, no entanto, apenas um reduzido número é realizado com diferentes linhas celulares relativas ao mesmo tipo de cancro. Para além disso, o número de estudos de avaliação do potencial efeito citotóxico do PFA no tratamento de linhas celulares representativas de carcinoma hepatocelular, é ainda reduzido, sendo por isso fundamental mais conhecimento nesta área (Smolková et al., 2019).

O nosso estudo contribui, assim, para uma maior compreensão do plasma frio atmosférico como tratamento para o carcinoma hepatocelular, demonstrando o seu efeito em três linhas distintas.

De acordo com os ensaios de citotoxicidade, é possível concluir que o tratamento com PFA induz um efeito anti-proliferativo em todas as linhas celulares de carcinoma hepatocelular em estudo, de uma forma dependente do tempo de exposição e dependente do

tempo de incubação após a terapia. No que respeita à atividade metabólica, verificou-se que para os maiores tempos de exposição à terapia, a sua diminuição foi mais acentuada, sendo em todos os casos superior a 50%. Verificou-se também que os efeitos do plasma eram igualmente dependentes do tempo de incubação após a exposição ao tratamento com PFA. Os resultados obtidos para o conteúdo proteico, corroboram os resultados obtidos pelo ensaio do MTT, observando-se uma diminuição deste à medida que aumenta o tempo de exposição ao PFA. Resultados semelhantes, no que diz respeito aos estudos de citotoxicidade, foram observados por outros autores, como Ferreira *et al.*, em linhas celulares de cancro da mama, da bexiga, osteosarcoma, cancro do pulmão, melanoma e cancro endometrial (Almeida-Ferreira *et al.*, 2021). Relativamente ao carcinoma hepatocelular, o mesmo foi demonstrado por Yan *et al.* em linhas tumorais do fígado (Li *et al.*, 2021).

Através da análise dos resultados obtidos nos ensaios de MTT e de SRB, foi ainda possível observar uma maior sensibilidade das linhas HuH7 e Hep3B, comparativamente à linha celular HepG2. Contrariamente às linhas anteriormente mencionadas, a linha HepG2 demonstrou uma menor sensibilidade ao tratamento, sugerindo assim que o efeito do tratamento com PFA depende da linha celular em causa e, por isso, deve ser considerado (Semmler *et al.*, 2020; Tanaka *et al.*, 2018). Esta diferença de sensibilidade ao tratamento pode também ser explicada pela diferença de expressão da P53 nestas linhas celulares distintas. Segundo a literatura, células que não expressem a P53 tendem a expressar mais aquaporinas, facilitando assim uma maior difusão de espécies reativas para dentro da célula (Yan, Sherman e Keidar, 2017). Uma vez que a linha HuH7 expressa esta proteína numa forma aberrante, e a linha Hep3B não a expressa, o número de aquaporinas na membrana destas células pode ser maior comparativamente à linha HepG2, contribuindo assim para uma maior entrada de espécies reativas que podem ser tóxicas para as células, sendo interessante a confirmação da expressão de aquaporinas nestas linhas celulares em estudos futuros.

Ainda com base nos resultados observados relativamente à citotoxicidade do PFA, foram selecionados três tempos de exposição distintos, nomeadamente os 15, os 60 e os 120 segundos, que prosseguiram para os restantes estudos, de forma a verificar se os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos induzidos pelo tratamento com o plasma frio atmosférico, poderiam ser dependentes do tempo de exposição, tal como verificado nos estudos de citotoxicidade.

Com vista a analisar em maior detalhe os mecanismos de morte celular inerentes ao tratamento com PFA avaliaram-se, através da citometria de fluxo, os diferentes tipos de morte celular, a progressão do ciclo celular e o potencial de membrana mitocondrial. Adicionalmente

ainda foram realizados ensaios de análise morfológica. Todos estes estudos foram realizados 48h após o tratamento com o PFA.

No que concerne aos diferentes tipos de morte celular induzida pelo tratamento com PFA, estudos têm vindo a reportar que esta ocorre maioritariamente por apoptose, no entanto, também já foram observados outros tipos de morte celular como necrose, autofagia e senescência, após exposição ao PFA (Arndt *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2020; Hirst *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2018; Semmler *et al.*, 2020). Os diferentes tipos de morte celular podem estar relacionados com o tempo de exposição ao tratamento, o tipo de linha celular em estudo, e a fonte de plasma (Semmler *et al.*, 2020).

Relativamente ao trabalho realizado nesta dissertação, quando aplicado o tratamento às linhas celulares de carcinoma hepatocelular, foi possível observar, através dos resultados preliminares da dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo, uma tendência para a diminuição da viabilidade celular, acompanhada por um aumento de células em apoptose e necrose. Na linha HuH7 foi possível observar um aumento de células em apoptose para os tempos de exposição mais curtos (15s e 60s), tendo-se verificado que, para o maior tempo de exposição, houve uma tendência para o aumento da percentagem de células em morte celular por necrose. Esta tendência foi igualmente observada nos ensaios de morfologia celular realizados, pela identificação da presença de células apoptóticas com evidência de *blebs* nos tempos mais curtos de exposição, e células com extravasamento do citoplasma, características de morte celular por necrose, após exposição de 120s. A linha HepG2 mostrou mais uma vez uma tendência a ser a menos sensível ao tratamento com PFA comparativamente às outras linhas. Para esta linha, foi notória uma tendência para uma maior percentagem de células em apoptose tardia ou necrose, não havendo diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição. Foi ainda possível, através dos ensaios de morfologia celular, verificar que esta linha apresenta alguma evidência de células em apoptose e necrose nos controlos, pela observação de *blebs* e extravasamento do citoplasma, respetivamente. Tal evidência permitiu corroborar a baixa viabilidade celular desta linha observada nos ensaios de citometria celular. Relativamente à linha Hep3B, foi possível observar uma tendência para que o tratamento com PFA induza um aumento de células em apoptose com o aumento do tempo de exposição. Os resultados apresentados, embora preliminares, estão em concordância com a literatura, uma vez que estudos com estas linhas celulares relatam a apoptose como a via de morte celular para a linha celular HuH7 e a apoptose tardia e necrose para a linha celular HepG2 após exposição ao tratamento (Smolková *et al.*, 2019). No entanto, como referido anteriormente, foi também possível observar necrose na linha celular HuH7 para o maior tempo de exposição

à terapia. Tal ocorrência pode ser explicada pelo forte estímulo oxidativo provocado nas células devido ao elevado tempo de exposição ao plasma frio atmosférico, uma vez que este está associado à morte celular por necrose (Semmler *et al.*, 2020). Contudo, para inferir conclusões será interessante a conclusão dos estudos preliminares relativos ao estudo da viabilidade e morte celular por citometria de fluxo. Além disso, de forma a corroborar e complementar os resultados obtidos no estudo da viabilidade e tipos de morte celular e na análise morfológica, seria de interesse o estudo das caspase 3 e 7 uma vez que a sua ativação está relacionada com a indução de morte apoptótica durante o stresse oxidativo (Shim *et al.*, 2017). Esta avaliação poderá ser realizada através de um substrato peptídico específico destas proteínas, como o DEVD, conjugado com um corante com afinidade para o DNA. Este ensaio é bastante robusto uma vez que não engloba períodos de lavagem nos quais células apoptóticas sensíveis podem ser facilmente descartadas (Smolková *et al.*, 2019). Alternativamente, também poderia ser utilizada a técnica de *western blot* para a avaliação das caspases mencionadas.

Analisando a progressão do ciclo celular, foi possível verificar que o tratamento com PFA induziu alterações no ciclo celular. Considerando os resultados preliminares observados nas linhas celulares HuH7 e HepG2 verificou-se uma tendência para uma diminuição de células em fase G_0/G_1 e fase S, com o aumento do tempo de exposição à terapia. Para além disso também foi possível observar uma tendência para um aumento de células em fase G_2/M . O aumento de células nesta fase do ciclo celular, tende a sugerir que o tratamento com PFA induz uma paragem do ciclo em G_2/M , prevenindo as células com danos genómicos de progredirem para a fase mitótica, na qual ocorre a sua divisão e consequente propagação. Tal tendência foi observada também por outros autores como Hasse *et. al* que verificaram que, de facto, o tratamento com PFA de uma linha celular de carcinoma oral de células escamosas levou a uma diminuição das células em fase G_0/G_1 e a um aumento significativo de células em fase G_2/M (Hasse *et al.*, 2019). Relativamente à linha celular Hep3B, embora se tenha verificado uma tendência para a diminuição de células em fase G_0/G_1 , verificou-se uma tendência para um aumento de células em fase S, contrariamente às outras linhas celulares em estudo. Este bloqueio do ciclo celular pode ser indicativo da capacidade do PFA de diminuir a síntese de DNA e/ou induzir lesões no DNA como as quebras de cadeia simples ou dupla (DSB) evitando assim a fase de replicação (Semmler *et al.*, 2020). Para além disso também a diferente expressão da proteína P53 pode estar envolvida nestas diferentes respostas induzidas pelo PFA. Segundo a literatura, a proteína P53 está envolvida nas principais vias de sinalização que regulam a fase G_1 , permitindo a reparação de danos na dupla cadeia e aumentando a probabilidade de sobrevivência das células lesadas, influenciando a decisão da célula entrar ou não em fase S

(Chen, 2016). Uma vez que as linhas HuH7 e HepG2 possuem esta proteína, os possíveis danos causados pelo PFA poderão ser reparados, e as células progridem no ciclo celular. Contrariamente às linhas anteriormente referidas, a linha celular Hep3B não expressa a proteína P53. É sabido da literatura que células que não expressem a P53 têm uma maior dificuldade em reparar os danos da dupla cadeia e conseqüentemente menor viabilidade (Chen, 2016). Assim, uma vez que a linha Hep3B não expressa esta proteína, poderá não ter capacidade de reparar os possíveis danos causados pelo PFA. Desta forma a paragem do ciclo pode ocorrer mais precocemente levando a uma diminuição da viabilidade destas células. Visto os resultados apresentados serem preliminares, surge a necessidade de um maior número de ensaios para confirmar as hipóteses colocadas. Poderá ser igualmente interessante avaliar se efetivamente o plasma frio atmosférico induzirá danos ao nível do DNA, através de estudos de genotoxicidade.

Relativamente ao potencial de membrana mitocondrial, é descrito na literatura que o tratamento com PFA induz despolarização da membrana mitocondrial, provocando morte celular mediada pela mitocôndria (Murakami, 2019). Através da análise dos resultados preliminares foi possível verificar uma tendência semelhante nas linhas celulares de carcinoma hepatocelular, HuH7, HepG2 e Hep3B. Para o tempo de exposição de 120s à terapia, todas as linhas celulares em estudo mostraram uma tendência para o aumento do potencial de membrana mitocondrial em relação ao controlo. Estes resultados tendem a indicar que o tratamento com PFA induziu uma despolarização da membrana e, conseqüentemente, morte celular por apoptose mediada pela mitocôndria. Foi também possível verificar uma maior sensibilidade para a linha Hep3B, visto ter sido a que demonstrou uma tendência para uma maior alteração do potencial de membrana em relação ao controlo. Para além das alterações no potencial da membrana mitocondrial, aquando da morte celular apoptótica induzida pela mitocôndria, ocorre também a libertação de fatores pró-apoptóticos para o citoplasma da célula (Kilbride e Prehn, 2013). O estudo dos fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo c, bem como das caspases ativadas por este, das quais a caspase 9 é exemplo, seria alvo de interesse para posteriores ensaios.

Vários estudos têm reportado as RONS produzidas pelo PFA, como os principais intervenientes biológicos na indução de morte celular em vários tipos de cancro (Li *et al.*, 2021). Desta forma, com este estudo pretendeu-se avaliar e quantificar as espécies reativas de oxigénio geradas pelo plasma, uma vez que são estas que estão descritas na literatura como indutoras de morte celular (Keidar e Fridman, 2020). Assim, foi avaliada a formação de peróxidos e de anião superóxido.

Através da análise dos resultados, foi possível verificar, que 2h horas após tratamento, o aumento do tempo de exposição levou a um maior decréscimo do conteúdo intracelular de peróxidos, nas linhas celulares em estudo. Contrariamente aos resultados obtidos, na literatura, vários autores reportam um aumento da concentração intracelular destes peróxidos após exposição ao tratamento (Yan *et al.*, 2017). Estes resultados, podem ser explicados pelo facto dos peróxidos, particularmente o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), só ser produzido durante o tratamento com PFA. Desta forma, uma vez terminada a exposição ao PFA, esta espécie poderá ser consumida pelas células tumorais (Yan *et al.*, 2017). Tal evento pode suportar os resultados obtidos para a baixa concentração de peróxidos. Uma outra hipótese, referente à quantidade de meio de cultura no qual as células estão sementeadas, também pode ser colocada. Estudos demonstraram que, quanto menor a quantidade de meio de cultura, maior a concentração de peróxido de hidrogénio formado com o tratamento com o plasma frio atmosférico e, por outro lado, quanto maior a quantidade de meio, menor a concentração desta espécie (Malyavko *et al.*, 2020). Uma vez que no nosso estudo foram utilizados 500 μ L de meio de cultura por poço, isso pode ser explicativo de uma baixa concentração de peróxido de hidrogénio. Adicionalmente à quantidade de meio utilizado nas células do tratamento, a confluência das células e a própria voltagem da descarga também pode afetar a formação de H_2O_2 (Yan *et al.*, 2017). Como referido inicialmente, a diminuição do conteúdo intracelular de peróxidos verificou-se de um modo mais acentuado às 2h de exposição ao PFA, não sendo tão evidente para as 6 e 24h após o tratamento. Tal acontecimento, pode ser justificado pela conversão dos peróxidos, nomeadamente o peróxido de hidrogénio, noutras espécies mais reativas como o radical hidroxilo, ou até pela sua destoxificação por defesas antioxidantes (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009). Desta forma, em estudos futuros seria de interesse averiguar se esta espécie reativa é mesmo consumida pelas células ou se é convertida noutras espécies reativas prejudiciais às células. Poderá também ser de interesse avaliar as defesas antioxidantes responsáveis pela destoxificação desta espécie, tal como a glutathione reduzida, por exemplo.

Relativamente ao anião superóxido, foi possível observar, para a linha HuH7, uma diminuição da sua concentração intracelular com o aumento do tempo de exposição à terapia, nas primeiras 2h horas após o tratamento com PFA. Tal diminuição pode ser explicada pelo facto do anião superóxido ser uma espécie reativa com tempo de semi-vida curto, e por esse motivo, vir a ser convertido pelas superóxido dismutases (SOD) numa espécie com um maior tempo de semi-vida como o peróxido de hidrogénio (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009). Por outro lado, nas linhas celulares HepG2 e Hep3B verificou-se um aumento desta

espécie para o mesmo tempo de exposição à terapia, podendo demonstrar que o anião superóxido possa ter um papel importante nos efeitos induzidos pelo plasma frio atmosférico. Em concordância com os resultados obtidos para estas linhas celulares, o aumento do anião superóxido também foi observado por Tavares-da-Silva *et al.*, em linhas celulares do cancro da bexiga (Tavares-da-Silva *et al.*, 2021). Considerando os resultados das duas espécies reativas de oxigénio estudadas neste trabalho, seria importante uma avaliação de outras espécies reativas produzidas pelo plasma frio atmosférico, tais como o radical hidroxilo, de modo a obter um maior conhecimento acerca da sua função no mecanismo de ação do mesmo. A avaliação das defesas antioxidantes responsáveis pela destoxificação das ROS pelas células, tais como a superóxido dismutase ou a glutatona reduzida, também poderão ser alvo de interesse para posteriores investigações.

Segundo a literatura, é sabido que na presença de metais de transição como é o caso do Fe^{2+} , o peróxido de hidrogénio pode ser convertido em radicais hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) que são altamente reativos e podem causar danos ao nível dos lípidos, proteínas e DNA. Para além disso, também o óxido nítrico poderá reagir com o anião superóxido e formar peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), uma espécie capaz de modificar a estrutura e função das proteínas. Desta forma, o estudo destas espécies pode contribuir para um maior conhecimento da sua função no mecanismo de ação do plasma (Yan *et al.*, 2017).

Para além do estudo das espécies reativas formadas, seria também de interesse o estudo das defesas antioxidantes das células, tal como referido anteriormente, de modo a avaliar a sua contribuição para a manutenção do equilíbrio *redox*. O balanço entre a entrada de ROS extracelulares e a resistência do sistema antioxidante intracelular, determina a concentração intracelular de ROS (Yan, Sherman e Keidar, 2017). Desta forma, o estudo das enzimas que contribuem para este processo, como a catalase, a superóxido dismutase, a família de glutatonas e moléculas mais pequenas como a GSH (glutatona reduzida) e o NADPH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), torna-se necessário.

No que respeita às linhas celulares em estudo, foi possível verificar algumas diferenças no que concerne à sua sensibilidade ao tratamento com plasma frio atmosférico. De um modo geral, a linha HepG2 foi a que demonstrou uma menor sensibilidade ao tratamento com PFA, e a linha celular HuH7 foi a que demonstrou uma maior sensibilidade. Uma vez que estas linhas expressam diferentes formas da proteína P53, pensa-se que esta proteína possa ser responsável pelas diferentes respostas. Ainda assim, há autores que sugerem uma resposta celular independente da P53 (Guerrero-preston *et al.*, 2014), pelo que o estudo de vias de morte independentes da P53 se torna pertinente. Como as mutações nesta proteína ou perda

da sua função estão associadas a mais de 50% dos câncros, principalmente em estágios avançados, são ainda necessários mais estudos de forma a compreender qual a sua influência no mecanismo de ação do plasma frio atmosférico (Trachootham, Alexandre e Huang, 2009).

Capítulo VI

Conclusão e Perspetivas Futuras

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial efeito terapêutico do plasma frio atmosférico no carcinoma hepatocelular, bem como clarificar os mecanismos de ação envolvidos na sua interação com as células tumorais. Com esse intuito, ao longo deste trabalho foram apresentados os resultados obtidos *in vitro* que realçam o potencial do plasma frio atmosférico no tratamento de um dos cancros mais comuns do fígado, o carcinoma hepatocelular. Adicionalmente, foram elucidados alguns dos possíveis mecanismos de ação subjacentes ao tratamento.

O plasma frio atmosférico demonstrou levar a uma diminuição da proliferação celular através da redução da atividade metabólica e do conteúdo proteico, de forma dependente do tempo de exposição e incubação à terapia. Este decréscimo da proliferação foi observado em todas as linhas celulares em estudo, contudo, a linha celular HuH7 demonstrou ser mais a sensível ao tratamento. O tratamento com PFA induziu, igualmente, uma tendência para a diminuição da viabilidade celular em todas as linhas, de uma forma dependente do tempo de exposição à terapia. Quanto ao tipo de morte induzida, foi possível verificar uma tendência na qual para tempos mais curtos de exposição ao PFA, a morte predominante é a morte celular por apoptose, e para os maiores tempos de exposição, a necrose é o tipo de morte celular preferencial. Relativamente ao ciclo celular, observou-se, de uma forma geral, uma tendência para que o plasma frio atmosférico seja responsável por induzir uma paragem do ciclo celular, principalmente na fase G₂/M. Ainda assim foram identificadas algumas alterações entre as diferentes linhas celulares que podem ser explicadas pelas diferenças genéticas existentes entre elas. No que respeita ao potencial de membrana mitocondrial, verificou-se que o plasma frio atmosférico para o maior tempo de exposição ao tratamento, induziu uma despolarização da membrana mitocondrial em todas as linhas celulares representativas de carcinoma hepatocelular.

Uma vez que a morte celular induzida pelo plasma frio atmosférico está geralmente associada ao efeito das RONS, de forma a compreender se estas são de facto o principal fator para o seu efeito terapêutico, procedeu-se à avaliação das espécies reativas de oxigénio. Verificou-se que o conteúdo intracelular de peróxidos diminuiu de uma forma dependente do tempo de exposição, para todas as linhas celulares, 2h após o tratamento. Por outro lado, a concentração intracelular de anião superóxido sofreu um aumento com o tempo de exposição ao plasma frio atmosférico, 2h horas após o tratamento, para todas as linhas celulares, com exceção da linha celular HuH7, podendo indicar que esta possa ter um papel importante nos efeitos induzidos após a exposição ao plasma frio atmosférico.

Desta forma, este trabalho permitiu compreender melhor a interação do plasma frio com as células tumorais representativas de carcinoma hepatocelular, com diferentes características moleculares, demonstrando o seu potencial efeito terapêutico nesta área. Ainda assim, para que o plasma frio atmosférico possa ser utilizado no futuro como abordagem terapêutica para este tipo de cânceros, é necessário ter em conta outros fatores que complementem o presente estudo.

Em estudos futuros, é de elevada importância a avaliação dos efeitos do plasma frio atmosférico em linhas celulares normais do fígado, para desta forma averiguar se de facto o tratamento é específico para as células tumorais, não causando danos noutras células do organismo. De igual modo, é também importante avaliar mais aprofundadamente quais os mecanismos que são responsáveis pela indução deste efeito anti-proliferativo e quais outras espécies reativas e defesas antioxidantes, mencionadas anteriormente, que possam estar envolvidas no processo. Para além disso, tendo em conta a complexidade do organismo humano, a realização de estudos *in vivo*, num modelo animal, são de extrema importância para acompanhar o crescimento do tumor e avaliar os possíveis efeitos secundários do plasma frio atmosférico num modelo mais aproximado do microambiente tumoral.

É notório que o plasma frio atmosférico demonstra ser uma terapia promissora, não só para o tratamento do carcinoma hepatocelular, como também de outro tipo de tumores. No entanto, esta tecnologia carece ainda de esclarecimento acerca dos mecanismos de ação responsáveis pelo seu efeito terapêutico, necessitando assim de uma maior investigação nesta área.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

- ADENIJI, Nia; DHANASEKARAN, Renumathy - Current and Emerging Tools for Hepatocellular Carcinoma Surveillance. **Hepatology Communications**. ISSN 2471-254X. 0:0 (2021) 15.
- AGGARWAL, Vaishali *et al.* - Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**. ISSN 2218-273X. 9:735 (2019) 26.
- AHMED, Asma; TAIT, Stephen W. G. - Targeting Immunogenic cell death in cancer. **Molecular Oncology**. ISSN 1574-7891. 14:12 (2020) 2994–3006.
- ALMEIDA-FERREIRA, Catarina *et al.* - Open-Air Cold Plasma Device Leads to Selective Tumor Cell Cytotoxicity. **Applied Sciences**. ISSN 2076-3417. 11:9 (2021) 4171.
- ARNDT, Stephanie *et al.* - Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. **Experimental Dermatology**. ISSN 09066705. 22:4 (2013) 284–289.
- ARNDT, Stephanie *et al.* - Effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on β -Defensins, Inflammatory Cytokines, and Apoptosis-Related Molecules in Keratinocytes In Vitro and In Vivo. **Plos One**. ISSN 1932-6203. 10:3 (2015) 16.
- BABINGTON, Parker *et al.* - Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer. **Biointerphases**. ISSN 1934-8630. 10:2 (2015) 029403.
- BAREKZI, N.; LAROUCI, M. - Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma. **Journal of Physics D: Applied Physics**. ISSN 0022-3727. 45:42 (2012) 422002.
- BEDNER, Elzbieta *et al.* - Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. **Cytometry**. ISSN 0196-4763. 35:3 (1999) 181–195.
- BEKESCHUS, Sander *et al.* - Differential Viability of Eight Human Blood Mononuclear Cell Subpopulations After Plasma Treatment. **Plasma Medicine**. ISSN 1947-5764. 3:1–2 (2013) 1–13.
- BEKESCHUS, Sander *et al.* - Physical Plasma Elicits Immunogenic Cancer Cell Death and Mitochondrial Singlet Oxygen. **IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences**. ISSN 2469-7311. 2:2 (2018) 138–146.
- BEKESCHUS, Sander; CLEMEN, Ramona; METELMANN, Hans-Robert - Potentiating anti-tumor immunity with physical plasma. **Clinical Plasma Medicine**. ISSN 22128166. 12:2018) 17–22.

BERNHARDT, Thoralf *et al.* - Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. ISSN 1942-0900. 2019:2019) 1–10.

BISCOP *et al.* - Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining Cancer Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 11:9 (2019) 1287.

BRANÝ, Dušan *et al.* - Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 21:8 (2020) 2932.

BUSCO, Giovanni *et al.* - The Emerging Potential of Cold Atmospheric Plasma in Skin Biology. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 08915849. 161:2020) 290–304.

CARRUBA, Giuseppe - Estrogens in Hepatocellular Carcinoma: Friends or Foes? **Cancers**. ISSN 2072-6694. 13:9 (2021) 2085.

CHEN, Jiandong - The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. ISSN 2157-1422. 6:3 (2016) 15.

CHEN, Zhiqian *et al.* - Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. **American journal of cancer research**. ISSN 2156-6976. 10:9 (2020) 2993–3036.

CHIBA, Kunitoshi *et al.* - Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. **Science**. ISSN 0036-8075. 357:6358 (2017) 1416–1420.

COELHO, Paulo G. *et al.* - Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. ISSN 15493296. 100A:7 (2012) 1901–1906.

COSSARIZZA, Andrea *et al.* - A New Method for the Cytofluorometric 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**. ISSN 0006291X. 197:1 (1993) 40–45.

D'ARCY, Mark S. - Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**. ISSN 1065-6995. 43:6 (2019) 582–592.

DAI, Xiaofeng *et al.* - Cold Atmospheric Plasma: A Promising Controller of Cancer Cell States. **Cancers**. ISSN 2072-6694. 12:11 (2020) 3360.

- DANNA, Natalie R. *et al.* - Assessment of Atmospheric Pressure Plasma Treatment for Implant Osseointegration. **BioMed Research International**. ISSN 2314-6133. 2015:2015) 1–8.
- DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* - Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. **Cytometry**. ISSN 0196-4763. 13:8 (1992) 795–808.
- DARZYNKIEWICZ, Zbigniew; BEDNER, Elzbieta; SMOLEWSKI, Piotr - Flow Cytometry in Analysis of Cell Cycle and Apoptosis. **Seminars in Hematology**. ISSN 00371963. 38:2 (2001) 179–193.
- DENIAUD, A. *et al.* - Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**. ISSN 0950-9232. 27:3 (2008) 285–299.
- DIKALOV, Sergey I.; HARRISON, David G. - Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. **Antioxidants & Redox Signaling**. ISSN 1523-0864. 20:2 (2014) 372–382.
- DOBRYNIN, Danil *et al.* - Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. **New Journal of Physics**. ISSN 1367-2630. 11:11 (2009) 115020.
- DONATO, María Teresa; TOLOSA, Laia; LECHÓN, María José Gómez- - **Protocols in In Vitro Hepatocyte Research**. New York, NY : Springer New York, 2015. ISBN 978-1-4939-2073-0.
- DUARTE, Simone; PANARIELLO, Beatriz H. D. - Comprehensive biomedical applications of low temperature plasmas. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. ISSN 00039861. 693:2020) 108560.
- ENGELAND, Manon VAN *et al.* - Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. **Cytometry**. ISSN 0196-4763. 31:1 (1998) 1–9.
- FERREIRA, Catarina Alexandra Almeida - **Plasma Frio Atmosférico Como Alternativa Terapêutica No Cancro Da Mama**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2019. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet: :<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/88213>.
- FILIPIĆ, Arijana *et al.* - Cold Plasma, a New Hope in the Field of Virus Inactivation. **Trends in Biotechnology**. . ISSN 01677799. 38:11 (2020) 1278–1291.

FILLA, Mark S. *et al.* - The role of integrins in glaucoma. **Experimental Eye Research**. ISSN 00144835. 158:2017) 124–136.

FIOR, Rita - Cancer - **When Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet**. Em FIOR, RITA. *Molecular and Cell Biology of Cancer Learning Materials in Biosciences*. Cham : Springer International Publishing, 2019. ISBN 978-3-030-11811-2. p. 1–20.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen - Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**. . ISSN 2156-6976. 7:5 (2017) 1016–1036.

FRIDMAN, Gregory *et al.* - Applied Plasma Medicine. **Plasma Processes and Polymers**. ISSN 1612-8869. 5:6 (2008) 503–533.

FRIEDMAN, Peter C. - Cold atmospheric pressure (physical) plasma in dermatology: where are we today? **International Journal of Dermatology**. ISSN 0011-9059. 59:10 (2020) 1171–1184.

FULORIA, Shivkanya *et al.* - Comprehensive Review of Methodology to Detect Reactive Oxygen Species (ROS) in Mammalian Species and Establish Its Relationship with Antioxidants and Cancer. **Antioxidants**. ISSN 2076-3921. 10:1 (2021) 128.

GAY-MIMBRERA, Jesús *et al.* - Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. **Advances in Therapy**. ISSN 0741-238X. 33:6 (2016) 894–909.

GEORGESCU, N.; LUPU, A. R. - Tumoral and Normal Cells Treatment With High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. **IEEE Transactions on Plasma Science**. ISSN 0093-3813. 38:8 (2010) 1949–1955.

GIRO, Gabriela *et al.* - Osseointegration assessment of chairside argon-based nonthermal plasma-treated Ca-P coated dental implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. ISSN 15493296. 101A:1 (2013) 98–103.

GLASAUER, Andrea; CHANDEL, Navdeep S. - Targeting antioxidants for cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**. ISSN 00062952. 92:1 (2014) 90–101.

GOMES, Marcos Antônio *et al.* - Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**. ISSN 01044230. 59:5 (2013) 514–524.

GÖRLACH, Agnes *et al.* - Calcium and ROS: A mutual interplay. **Redox Biology**. ISSN 22132317. 6:2015) 260–271.

- GRANATA, Vincenza *et al.* - Diagnostic evaluation and ablation treatments assessment in hepatocellular carcinoma. **Infectious Agents and Cancer**. ISSN 1750-9378. 16:1 (2021) 22.
- GREWAL, Udhayvir Singh *et al.* - Hepatitis B and C Viruses, Their Coinfection and Correlations in Chronic Liver Disease Patients: A Tertiary Care Hospital Study. **International journal of applied & basic medical research**. ISSN 2229-516X. 8:4 (2018) 204–209.
- GUERRERO-PRESTON, Rafael *et al.* - Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. **International Journal of Molecular Medicine**. ISSN 1107-3756. 34:4 (2014) 941–946.
- GYANANI, Vijay; HALEY, Jeffrey C.; GOSWAMI, Roshan - Challenges of Current Anticancer Treatment Approaches with Focus on Liposomal Drug Delivery Systems. **Pharmaceuticals**. ISSN 1424-8247. 14:9 (2021) 835.
- HAN, Xu *et al.* - DNA damage in oral cancer cells induced by nitrogen atmospheric pressure plasma jets. **Applied Physics Letters**. ISSN 0003-6951. 102:23 (2013) 6.
- HAN, Xu *et al.* - Plasmid DNA damage induced by helium atmospheric pressure plasma jet. **The European Physical Journal D**. ISSN 1434-6060. 68:3 (2014) 7.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. - The Hallmarks of Cancer. **Cell**. ISSN 00928674. 100:1 (2000) 57–70.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. - Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. ISSN 00928674. 144:5 (2011) 646–674.
- HASSE, Sybille *et al.* - Cold Argon Plasma as Adjuvant Tumour Therapy on Progressive Head and Neck Cancer: A Preclinical Study. **Applied Sciences**. ISSN 2076-3417. 9:10 (2019) 2061.
- HE, Shuai; TANG, Shilei - WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. ISSN 07533322. 132:2020) 110851.
- HELMKE, Andreas; GERLING, Torsten; WELTMANN, Klaus-Dieter - **Plasma Sources for Biomedical Applications**. Em *Comprehensive Clinical Plasma Medicine*. Cham : Springer International Publishing, 2018. ISBN 9783319676272. p. 23–41.
- HIRST, A. M. *et al.* - Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. **British Journal of Cancer**. ISSN 0007-0920. 112:9 (2015) 1536–1545.

HU, Jianming; LIU, Kuancheng; LUO, Jun - **HIV–HBV and HIV–HCV Coinfection and Liver Cancer Development**. Em HIV/AIDS-Associated Viral Oncogenesis. ISBN 978-3-030-03502-0 p. 231–250.

ISBARY, G. *et al.* - Randomized placebo-controlled clinical trial showed cold atmospheric argon plasma relieved acute pain and accelerated healing in herpes zoster. **Clinical Plasma Medicine**. ISSN 22128166. 2:2 (2014) 50–55.

ISBARY, Georg *et al.* - Cold atmospheric plasma devices for medical issues. **Expert Review of Medical Devices**. ISSN 1743-4440. 10:3 (2013) 367–377.

IZADJOO, Mina *et al.* - Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the science. **Journal of Wound Care**. ISSN 0969-0700. 27:9 (2018) 4–10.

KAUSHIK, Nagendra *et al.* - Plasma and Nanomaterials: Fabrication and Biomedical Applications. **Nanomaterials**. ISSN 2079-4991. 9:1 (2019) 98.

KAWAMOTO, Masaki *et al.* - Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines. **Frontiers in Genetics**. . ISSN 1664-8021. 11:2020).

KEIDAR, M. *et al.* - Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. **British Journal of Cancer**. ISSN 0007-0920. 105:9 (2011) 1295–1301.

KEIDAR, Michael; FRIDMAN, Alexander - **Cancer Applications Overview**. Em Plasma Cancer Therapy. Springer Series on Atomic, Optical, and Plasma Physics, vol 115. Springer, Cham. ISBN 978-3-030-49966-2 p. 75–89.

KHALILI, Marian *et al.* - Non-thermal plasma-induced immunogenic cell death in cancer. **Journal of Physics D: Applied Physics**. . ISSN 0022-3727. 52:42 (2019) 423001.

KHEMLINA, Galina; IKEDA, Sadakatsu; KURZROCK, Razelle - The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. **Molecular Cancer**. . ISSN 1476-4598. 16:1 (2017) 149.

KILBRIDE, S. M.; PREHN, J. H. M. - Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. **Oncogene**. . ISSN 0950-9232. 32:22 (2013) 2703–2711.

KIM, Chul-Ho *et al.* - Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells. **Journal of Biotechnology**. . ISSN 01681656. 150:4 (2010) 530–538.

KIM, Eunsun; VIATOUR, Patrick - Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks.

Experimental & Molecular Medicine. . ISSN 1226-3613. 52:12 (2020) 1898–1907.

KIM, Jae Young *et al.* - Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. **Biosensors and Bioelectronics.** ISSN 09565663. 28:1 (2011) 333–338.

KIM, Sun Ja *et al.* - Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. **Applied Physics Letters.** . ISSN 0003-6951. 97:2 (2010) 023702.

KLETTSCHKUS, Karsten *et al.* - Review of Innovative Physical Therapy Methods: Introduction to the Principles of Cold Physical Plasma. **In Vivo.** . ISSN 0258-851X. 34:6 (2020) 3103–3107.

KOBAN, Ina *et al.* - Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. **New Journal of Physics.** . ISSN 1367-2630. 12:7 (2010) 073039.

KONSTANTINOU, Dimitris; DEUTSCH, Melanie - The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristics, viral interactions and management. **Annals of gastroenterology.** . ISSN 1108-7471. 28:2 (2015) 221–228.

KOOPMAN, G. *et al.* - Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. **Blood.** . ISSN 0006-4971. 84:5 (1994) 1415–20.

KÖRITZER, Julia - **Introduction.** Em *Biophysical Effects of Cold Atmospheric Plasma on Glial Tumor Cells*. Springer Theses. Cham : Springer International Publishing, 2014. ISBN 978-3-319-06223-5. p. 1–18.

LEE, H. J. *et al.* - Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. **New Journal of Physics.** . ISSN 1367-2630. 11:11 (2009) 115026.

LI, Yan *et al.* - Selective Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated Medium and Its High Efficacy with Cisplatin on Hepatocellular Carcinoma with Cancer Stem Cell Characteristics. **International Journal of Molecular Sciences.** . ISSN 1422-0067. 22:8 (2021) 3956.

LI, Yan *et al.* - Cold Atmospheric Pressure Plasma-Activated Medium Induces Selective Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Independently of Singlet Oxygen, Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide and Nitrite/Nitrate. **International Journal of Molecular Sciences.** . ISSN 1422-0067. 22:11 (2021) 5548.

LIEDTKE, Kim Rouven *et al.* - A myeloid and lymphoid infiltrate in murine pancreatic tumors

exposed to plasma-treated medium. **Clinical Plasma Medicine**. . ISSN 22128166. 11:2018) 10–17.

LIN, Abraham *et al.* - Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. **Plasma Processes and Polymers**. . ISSN 16128850. 12:12 (2015) 1392–1399.

LIN, Abraham *et al.* - Non-Thermal Plasma as a Unique Delivery System of Short-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species for Immunogenic Cell Death in Melanoma Cells. **Advanced Science**. . ISSN 2198-3844. 6:6 (2019) 1802062.

LLOVET, Josep; BRÚ, Concepció; BRUIX, Jordi - Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: The BCLC Staging Classification. **Seminars in Liver Disease**. . ISSN 0272-8087. 19:03 (1999) 329–338.

LLOVET, Josep M. *et al.* - Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**. . ISSN 2056-676X. 2:1 (2016) 23.

LLOVET, Josep M. *et al.* - Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**. . ISSN 2056-676X. 7:6 (2021) 24.

LOPES, Beatriz Pinheiro - **Cold Atmospheric Plasma In The Treatment Of Retinoblastoma** Coimbra: Universidade de Coimbra, 2019. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/86186>.

MALYAVKO, Alisa *et al.* - Cold atmospheric plasma cancer treatment, direct versus indirect approaches. **Materials Advances**. . ISSN 2633-5409. 1:6 (2020) 1494–1505.

MARIOTTI, Sabrina *et al.* - A method permissive to fixation and permeabilization for the multiparametric analysis of apoptotic and necrotic cell phenotype by flow cytometry. **Cytometry Part A**. . ISSN 15524922. 91:11 (2017) 1115–1124.

MASHAYEKH, Shahriar *et al.* - Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer treatment (B/16-F10). **Physics of Plasmas**. . ISSN 1070-664X. 22:9 (2015) 093508.

METELMANN, Hans-Robert; WOEDTKE, Thomas VON; WELTMANN, Klaus-Dieter (EDS.) - **Comprehensive Clinical Plasma Medicine**. Cham : Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-67626-5.

MEYER, F.; SMIT, Berend - Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. . ISSN 0027-8424. 106:10 (2009) 3654–3658.

MILLER, Vandana *et al.* - Plasma Stimulation of Migration of Macrophages. **Plasma Processes and Polymers**. . ISSN 16128850. 11:12 (2014) 1193–1197.

MIŠÍK, Miroslav *et al.* - Use of human derived liver cells for the detection of genotoxins in comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. . ISSN 13835718. 845:2019) 402995.

MOAWAD, Ahmed W. *et al.* - Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma; Pathophysiology, Targeted Therapy, and Role of Imaging. **Journal of Hepatocellular Carcinoma**. . ISSN 2253-5969. 7:2020) 77–89.

MONCADA, Salvador; ERUSALIMSKY, Jorge D. - Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. . ISSN 1471-0072. 3:3 (2002) 214–220.

MURAKAMI, Tomoyuki - Numerical modelling of the effects of cold atmospheric plasma on mitochondrial redox homeostasis and energy metabolism. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 9:1 (2019) 17138.

NAON, Deborah; SCORRANO, Luca - At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. . ISSN 01674889. 1843:10 (2014) 2184–2194.

NISHIDA, Naoshi - Metabolic disease as a risk of hepatocellular carcinoma. **Clinical and Molecular Hepatology**. . ISSN 2287-2728. 27:1 (2021) 87–90.

NOGUEIRA, Mateus L. *et al.* - *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) rhizome essential oil causes cell cycle arrest in the G2/M phase and cell death in HepG2 cells and inhibits the development of tumors in a xenograft model. **Molecules**. . ISSN 14203049. 25:11 (2020).

OLIVEIRA, Ana Sofia Cartaxo Pinto - **Automatizing The Application Of Cold Atmospheric Plasma In Tumor Cells** Coimbra: Universidade de Coimbra, 2019. Disponível na Internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/87925>

ORELLANA, Esteban; KASINSKI, Andrea - Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to

Investigate Cell Proliferation. **BIO-PROTOCOL**. . ISSN 2331-8325. 6:21 (2016).

OZKAN, Hasan *et al.* - Updates on the Diagnosis and Management of Hepatocellular Carcinoma. **Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology**. . ISSN 2231-5047. 11:1 (2021) 32–40.

PAAL, Jonas VAN DER *et al.* - Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. **Chemical Science**. . ISSN 2041-6520. 7:1 (2016) 489–498.

PEREIRA, Eurico José Gonçalves - **Plasma Frio Atmosférico no Tratamento do Cancro da Bexiga**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2019. [Consult. 8 abr. 2021].

PERRY, Seth W. *et al.* - Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide. **BioTechniques**. . ISSN 0736-6205. 50:2 (2011) 98–115.

PETRONI, Maria Letizia *et al.* - Management of non-alcoholic fatty liver disease. **BMJ**. . ISSN 1756-1833. 372:2021) 20.

PETRUZZIELLO, Arnolfo - Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma. **The Open Virology Journal**. . ISSN 1874-3579. 12:1 (2018) 26–32.

PIATON, E. *et al.* - Guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFA). **Cytopathology**. . ISSN 09565507. 27:5 (2016) 359–368.

PRÄBST, Konstantin *et al.* - **Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin**. Em *Methods in Molecular Biology*. ISBN 9781493969609v. 1601. p. 1–17.

PRIVAT-MALDONADO, Angela *et al.* - ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. . ISSN 1942-0900. 2019:2019) 1–29.

PTASIŃSKA, Sylwia *et al.* - DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet. **Physical Chemistry Chemical Physics**. . ISSN 1463-9076. 12:28 (2010) 7779–7781.

QIU, Guo-Hua *et al.* - Distinctive Pharmacological Differences Between Liver Cancer Cell Lines HepG2 and Hep3B. **Cytotechnology**. . ISSN 0920-9069. 67:1 (2015) 1–12.

RATOVITSKI, Edward A. *et al.* - Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. **Plasma Processes and Polymers**. . ISSN 16128850. 11:12 (2014) 1128–1137.

RATURI, Arun; SIMMEN, Thomas - Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. . ISSN 01674889. 1833:1 (2013) 213–224.

REBOUISSOU, Sandra; NAULT, Jean-Charles - Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**. . ISSN 01688278. 72:2 (2020) 215–229.

SAGNELLI, Evangelista *et al.* - Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma. **Infection**. . ISSN 0300-8126. 48:1 (2020) 7–17.

SAKUDO, Akikazu *et al.* - Crucial roles of reactive chemical species in modification of respiratory syncytial virus by nitrogen gas plasma. **Materials Science and Engineering: C**. . ISSN 09284931. 74:2017) 131–136.

SAKUDO, Akikazu; YAGYU, Yoshihito; ONODERA, Takashi - Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 1422-0067. 20:20 (2019) 5216.

SAPISOCHIN, Gonzalo; BRUIX, Jordi - Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. . ISSN 1759-5045. 14:4 (2017) 203–217.

SCHNEIDER, Christin *et al.* - Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 8:1 (2018) 10048.

SEMMLER, Marie Luise *et al.* - Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. **Cancers**. . ISSN 2072-6694. 12:2 (2020) 269.

SHAUL, Merav E.; FRIDLENDER, Zvi G. - Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**. . ISSN 1759-4774. 16:10 (2019) 601–620.

SHIBATA, Tatsuhiro - Genomic landscape of hepatocarcinogenesis. **Journal of Human Genetics**. . ISSN 1434-5161. 66:9 (2021) 845–851.

SHIM, Man Kyu *et al.* - Caspase-3/-7-Specific Metabolic Precursor for Bioorthogonal Tracking

of Tumor Apoptosis. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 7:1 (2017) 16635..

SILVA-TEIXEIRA, Rafael *et al.* - Plasma activated media and direct exposition can selectively ablate retinoblastoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**. . ISSN 08915849. 171:2021) 302–313.

ŠIMONČICOVÁ, Juliana *et al.* - Technical applications of plasma treatments: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. . ISSN 0175-7598. 103:13 (2019) 5117–5129.

SINGAL, Amit G.; LAMPERTICO, Pietro; NAHON, Pierre - Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. **Journal of Hepatology**. . ISSN 01688278. 72:2 (2020) 250–261.

SMOLKOVÁ, Barbora *et al.* - Non-Thermal Plasma, as a New Physicochemical Source, to Induce Redox Imbalance and Subsequent Cell Death in Liver Cancer Cell Lines. **Cellular Physiology and Biochemistry**. . ISSN 10158987. 52:1 (2019) 119–140.

SOLAINI, Giancarlo *et al.* - Evaluating Mitochondrial Membrane Potential in Cells. **Bioscience Reports**. . ISSN 0144-8463. 27:1–3 (2007) 11–21.

SUNG, Hyuna *et al.* - Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. . ISSN 0007-9235. 71:3 (2021) 209–249.

TABARES, Francisco L.; JUNKAR, Ita - Cold Plasma Systems and Their Application in Surface Treatments for Medicine. **Molecules**. . ISSN 1420-3049. 26:7 (2021) 1903.

TANAKA, Hiromasa *et al.* - Glioblastoma Cell Lines Display Different Sensitivities to Plasma-Activated Medium. **IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences**. . ISSN 2469-7311. 2:2 (2018) 99–102.

TARPEY, Margaret M.; WINK, David A.; GRISHAM, Matthew B. - Methods for Detection of Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. . ISSN 0363-6119. 286:3 (2004) R431–R444.

TAVARES-DA-SILVA, Edgar *et al.* - Cold Atmospheric Plasma, a Novel Approach against Bladder Cancer, with Higher Sensitivity for the High-Grade Cell Line. **Biology**. ISSN 2079-7737. 10:1 (2021) 41.

- TEIXEIRA, Rafael Eduardo Da Silva - **Targeting Cancer With Cold Atmospheric Plasma**. [Consult. 8 abr. 2021] Coimbra: Universidade de Coimbra, 2019. Disponível na Internet: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/82236>.
- TORNIN, Juan *et al.* - Evaluation of the effects of cold atmospheric plasma and plasma-treated liquids in cancer cell cultures. **Nature Protocols**. . ISSN 1754-2189. 16:6 (2021) 2826–2850.
- TRACHOOTHAM, Dunyaporn; ALEXANDRE, Jerome; HUANG, Peng - Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews Drug Discovery**. . ISSN 1474-1776. 8:7 (2009) 579–591.
- UTSUMI, Fumi *et al.* - Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE**. . ISSN 1932-6203. 8:12 (2013) e81576.
- VANDAMME, Marc *et al.* - ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. **International Journal of Cancer**. . ISSN 00207136. 130:9 (2012) 2185–2194. doi: 10.1002/ijc.26252.
- VERMES, István *et al.* - A Novel Assay for Apoptosis Flow cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**. . ISSN 00221759. 184:1 (1995) 39–51.
- VIBERT, Eric; SCHWARTZ, Myron; OLTHOFF, Kim M. - Advances in resection and transplantation for hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**. . ISSN 01688278. 72:2 (2020) 262–276.
- VICHAJ, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim - Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. **Nature Protocols**. . ISSN 1754-2189. 1:3 (2006) 1112–1116.
- WANG, Peiyu *et al.* - Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances Cancer Cell Sensitivity to Cytotoxic Effects of Cold Atmospheric Plasmas in Breast and Bladder Cancer Systems. **Cancers**. . ISSN 2072-6694. 13:12 (2021) 2889.
- WOJTALA, Aleksandra *et al.* - **Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry**. Em *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., 2014. ISBN 9780124166189v. 542. p. 243–262.
- YAN, Dayun *et al.* - Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma - A model based on aquaporins (Review). **Biointerphases**. . ISSN 1934-8630. 10:4 (2015) 040801.

YAN, Dayun *et al.* - The Strong Cell-based Hydrogen Peroxide Generation Triggered by Cold Atmospheric Plasma. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 7:1 (2017) 10831.

YAN, Dayun *et al.* - **Current Understanding of Mechanisms in Plasma Cancer Therapy and Recent Advances in Technology**. Springer, Cham. ISBN 978-3-030-49965-5 p. 271–287

YAN, Dayun; SHERMAN, Jonathan H.; KEIDAR, Michael - Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. **Oncotarget**. . ISSN 19492553. 8:9 (2017) 15977–15995.

YAN, Dayun; SHERMAN, Jonathan H.; KEIDAR, Michael - The Application of the Cold Atmospheric Plasma-Activated Solutions in Cancer Treatment. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. . ISSN 18715206. 18:6 (2017) 769–775.

YAN, Dayun; SHERMAN, Jonathan H.; KEIDAR, Michael - Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. **Oncotarget**. . ISSN 1949-2553. 8:9 (2017) 15977–15995.

YANG, Ju Dong *et al.* - A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. . ISSN 1759-5045. 16:10 (2019) 589–604.

YANG, Ju Dong; HEIMBACH, Julie K. - New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. **BMJ**. . ISSN 1756-1833. 371:2020) 35–44.

YOSHIKAWA, Nobuhisa *et al.* - Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 10:1 (2020) 1614.

ZEESHAN, Hafiz *et al.* - Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 1422-0067. 17:3 (2016) 327.

ZIRNHELD, Jennifer L. *et al.* - Nonthermal Plasma Needle: Development and Targeting of Melanoma Cells. **IEEE Transactions on Plasma Science**. . ISSN 0093-3813. 38:4 (2010) 948–952.

ZIUZINA, Dana *et al.* - Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors. **PLOS ONE**. . ISSN 1932-6203. 10:9 (2015) e0138209.

ZOROVA, Ljubava D. *et al.* - Mitochondrial Membrane Potential. **Analytical Biochemistry**. . ISSN 00032697. 552:2018) 50–59.

ZUCMAN-ROSSI, Jessica; NAULTAND, Jean-Charles - **The Liver**. Wiley, 2020. ISBN 9781119436829.