



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Filipa Cruz Soares Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “To explore the use of a BH3-mimetic (ABT-737) as a chemosensitizer of osteosarcoma cells to doxorubicin” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Maria Teresa Murta, do Dr. José Carlos Costa e da Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Inês Filipa Cruz Soares Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “To explore the use of a BH3-mimetic (ABT-737) as a chemosensitizer of osteosarcoma cells to doxorubicin” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Maria Teresa Murta, do Dr. José Carlos Costa e da Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2019

Eu, Inês Filipa Cruz Soares Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015219159, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 6 de setembro de 2019.

---

(Inês Filipa Cruz Soares Silva)

*À minha Mãe, que fez de mim o que sou hoje.*

*A razão principal do meu sucesso.*

# Agradecimentos

*À Professora Doutora Maria Teresa Cruz, por ter aceite ser minha orientadora e pelo carinho e disponibilidade demonstrados.*

*À equipa da Farmácia Lusitana, especialmente ao Dr. José Carlos e à Dra. Cláudia, pelo apoio constante, por tudo o que me ensinaram e pelo exemplo de pessoas e profissionais que são.*

*À Dra. Maria Teresa Murta, por ter acreditado em mim e me ter dado a oportunidade de integrar a equipa da QP&C, e a toda a equipa pelo apoio e companheirismo.*

*À Carolina, a melhor pessoa que poderia ter encontrado para me integrar e ensinar, por todos os valores transmitidos e pela amizade.*

*À Dra. Célia Gomes, por me ter proporcionado a oportunidade de alcançar um dos meus mais antigos objetivos, pelos conhecimentos transmitidos e por ter orientado este projeto.*

*À Dra. Mylène Carrascal, pela ajuda nos ensaios de citometria e PCR.*

*À Sara, à Liliana e em especial à Marina, pela amizade, pelo apoio e pela companhia nas longas horas de trabalho.*

*Às minhas amigas da CESPU, que iniciaram este caminho comigo e estiveram presentes em todos os momentos.*

*À Raquel, que mesmo depois de tantos anos me mostrou que a amizade tem sempre por onde crescer, e que me ensinou a enfrentar os desafios e a vida de cabeça erguida.*

*Ao André, que fez esta caminhada ao meu lado do início ao fim, e que se tornou no melhor companheiro que podia ter tido.*

*Ao Pedro, pela alegria contagiante, por nunca desistir de mim e por dar cor à minha vida mesmo nos momentos mais difíceis.*

*À minha família, aos meus pais que sempre me incentivaram e proporcionaram a oportunidade de chegar até aqui.*

*A Coimbra, que me deu tanto.*

# Índice

## I - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	8
ABREVIATURAS .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. ANÁLISE SWOT .....	11
2.1 FORÇAS .....	11
2.1.1 Acolhimento e equipa da QP&C.....	11
2.1.2 Mapeamento de processos.....	12
2.1.3 Integração no Kaizen diário.....	12
2.1.4 Acompanhamento dos processos no terreno.....	13
2.1.5 Integração na equipa da Qualidade na Supervisão da produção.....	14
2.2 FRAQUEZAS .....	15
2.2.1 Duração do estágio.....	15
2.3 OPORTUNIDADES .....	15
2.3.1 Ações de formação.....	15
2.3.2 Visão geral do funcionamento da Indústria Farmacêutica.....	16
2.3.3 Auditorias externas.....	16
2.4 AMEAÇAS .....	17
2.4.1 Lacunas no plano curricular do MICF.....	17
2.4.2 Áreas de estágio limitadas.....	17
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	19
BIBLIOGRAFIA .....	20

## II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

RESUMO .....	22
ABSTRACT .....	22
ABREVIATURAS .....	22
1. INTRODUÇÃO .....	23
2. ANÁLISE SWOT .....	24
2.1 FORÇAS .....	24
2.1.1 Localização e população abrangida.....	24
2.1.2 Variedade de produtos e serviços.....	24
2.1.3 Laboratório de medicamentos manipulados.....	25
2.1.4 Indicação e intervenção Farmacêutica.....	25
2.2 FRAQUEZAS .....	26
2.2.1 Receituário manual.....	26
2.2.2 Lacunas no plano curricular do MICF.....	27
2.3 OPORTUNIDADES .....	27
2.3.1 Iniciativas junto da comunidade.....	27
2.3.2 Ações de formação.....	28
2.3.3 Novo módulo de atendimento do Sifarma.....	29
2.4 AMEAÇAS .....	30
2.4.1 Competências de comunicação.....	30
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
BIBLIOGRAFIA .....	32
ANEXO I.....	33
ANEXO II .....	35

## III - MONOGRAFIA

ABSTRACT.....	37
RESUMO .....	38
LIST OF ABBREVIATIONS.....	39
LIST OF TABLES.....	41
LIST OF FIGURES .....	41
1. INTRODUCTION.....	42
1.1 OSTEOSARCOMA .....	42
1.1.1 Etiology and Epidemiology.....	42
1.1.2 Pathogenesis and cells-of-origin.....	43
1.2 THERAPEUTIC APPROACHES .....	44
1.2.1 Doxorubicin.....	45
1.2.2 Cisplatin.....	45
1.2.3 Methotrexate.....	46
1.2.4 Resistance to therapy.....	46
1.3 THE BCL-2 PROTEIN FAMILY .....	48
1.3.1 BH3 mimetics .....	49
1.3.2 ABT-737.....	50
1.4 OBJECTIVES .....	51
2. MATERIALS AND METHODS.....	52
2.1 CELL CULTURE.....	52
2.1.1 Cell counting and viability.....	52
2.2 CYTOTOXICITY ASSAYS .....	52
2.2.1 MTT reduction assay.....	53
2.2.2 Apoptosis analysis by flow cytometry.....	54
2.3 SYNERGY EVALUATION.....	55
2.4 GENE EXPRESSION ANALYSIS .....	55
2.4.1 RNA extraction .....	55
2.4.2 cDNA synthesis.....	56
2.4.3 qRT-PCR.....	56
2.5 STATISTICAL ANALYSIS .....	57
3. RESULTS.....	58
3.1 SENSITIVITY OF MG-63 AND MNNG/HOS OSTEOSARCOMA CELLS TO DOXORUBICIN.....	58
3.2 SENSITIVITY OF MG-63 AND MNNG/HOS CELLS TO ABT-737.....	58
3.3 ABT-737 AND DOXORUBICIN SYNERGISTICALLY DECREASED VIABILITY OF OSTEOSARCOMA CELLS.....	60
3.4 TREATMENT WITH ABT-737 SENSITIZES OSTEOSARCOMA CELLS TO APOPTOTIC CELL DEATH.....	61
3.5 ABT-737 TREATMENT MODULATES EXPRESSION OF PLURIPOTENCY RELATED TRANSCRIPTS.....	63
4. DISCUSSION.....	65
5. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES .....	68
REFERENCES.....	69

# *I - Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica*

*Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA  
Orientado pela Dra. Maria Teresa Murta*



## **Resumo**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas culmina na realização de um Estágio Curricular na fase final do curso. A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra possibilita aos seus alunos a realização de um estágio em áreas para além da clássica área de atuação do Farmacêutico.

Ao longo de três meses tive a oportunidade de estagiar na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA, adquirindo e consolidando conhecimentos chave na área da Indústria Farmacêutica.

O presente relatório é apresentado tendo por base uma análise SWOT, fazendo uma análise crítica e retrospectiva dos fatores positivos e negativos que influenciaram o estágio.

**Palavras-chave:** Relatório de Estágio; Indústria Farmacêutica; Bluepharma; Análise SWOT.

## **Abstract**

The Integrated Master in Pharmaceutical Sciences culminates in the completion of a Curricular Internship in the final phase of the course. The Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra enables its students to undertake an internship in areas beyond the classic area of pharmaceutical practice.

Over the course of three months I had the opportunity to intern at Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA, acquiring and consolidating key knowledge in the Pharmaceutical Industry area.

This report is presented based on a SWOT analysis, performing a critical and retrospective analysis of the positive and negative factors that influenced the internship.

**Keywords:** Internship Report; Pharmaceutical Industry; Bluepharma; SWOT analysis.

## **Abreviaturas**

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**DT** – Direção Técnica

**EMA** – European Medicines Agency

**FDA** – Food and Drug Administration

**FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**GMP** – Good Manufacturing Practice

**HPLC** – High-performance Liquid Chromatography

**IF** – Indústria Farmacêutica

**KFDA** – Korea Food and Drug Administration

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**PDCA** – Plan, Do, Check, Act

**QP&C** – Qualidade do Produto & Compliance

**RH** – Recursos Humanos

**SFDA** – Saudi Food and Drug Authority

**SOP** – Standard Operation Procedure

**SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **I. Introdução**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas proporciona aos alunos uma vasta formação académica e uma panóplia de saídas profissionais em diferentes ramos do setor farmacêutico. Os 9 semestres de formação teórica e prática culminam num estágio de 6 meses em ambiente real, habitualmente em Farmácia Comunitária ou Farmácia Hospitalar. Valorizando a experiência profissional e a qualificação de profissionais capacitados a intervir em diversas áreas do domínio farmacêutico, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) estabelece protocolos com várias entidades do setor farmacêutico de modo a proporcionar aos seus alunos a oportunidade de experienciar outras áreas da atividade farmacêutica.

Deste modo, realizei um estágio de 3 meses em Indústria Farmacêutica, nomeadamente na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA, abaixo descrito.

A Bluepharma iniciou a sua atividade em 2001 após a aquisição da unidade fabril da Bayer sediada em Coimbra. Atualmente é já um grupo de 18 empresas com delegações em 4 países e um dos mais empreendedores e inovadores no setor. [1] A sua atividade integra toda a cadeia de valor do medicamento: desde a investigação, desenvolvimento e registo, ao fabrico, exportação e introdução no mercado. Assim, o Grupo Bluepharma tem a missão de investir, com vista a inovar e internacionalizar, sempre com foco na qualidade. [2]

Após concorrer ao estágio, na sequência de duas entrevistas, fui selecionada para integrar o departamento da Qualidade do Produto & Compliance (QP&C) e Direção Técnica (DT), sob orientação da Diretora Técnica/*Qualified Person* Dra. Maria Teresa Murta e tutela da Dra. Carolina Almeida.

A DT departamento da QP&C encontra-se sob direção da Dra. Maria Teresa Murta e divide-se em vários grupos, entre os quais: Equipamentos/Sistemas; Apoio à Produção; Apoio ao Analítico; Apoio ao Desenvolvimento Galénico e Certificação de Lotes. No decorrer do estágio integrei o grupo de Apoio à Produção, mais precisamente na equipa de Supervisão da Produção, que se encontra sediada na área fabril.

O presente relatório foi elaborado tendo por base uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) e pretende analisar as competências adquiridas durante o estágio. Desta forma foram sintetizados os pontos principais do estágio em indústria farmacêutica, no que diz respeito às forças e fraquezas (ambiente interno) e às oportunidades e ameaças (ambiente externo) que influenciaram o estágio relativamente à articulação das aptidões adquiridas com os conteúdos programáticos do curso e a sua adequação às perspetivas profissionais.

## 2. Análise Swot

Tabela I – Quadro resumo da análise SWOT

	<i>Fatores positivos</i>	<i>Fatores negativos</i>
<i>Ambiente interno</i>	<b>Forças</b> Acolhimento e equipa da QP&C Mapeamento de processos Integração no Kaizen diário Acompanhamento dos processos no terreno Integração na equipa da Qualidade na Supervisão da Produção	<b>Fraquezas</b> Duração do estágio
<i>Ambiente externo</i>	<b>Oportunidades</b> Visão geral do funcionamento da IF Ações de formação Auditorias externas	<b>Ameaças</b> Lacunas no plano curricular do MICF Estágio não creditado

### 2.1 Forças

#### 2.1.1 Acolhimento e equipa da QP&C

Um dos pontos fortes da Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA., prende-se com o acolhimento dos novos colaboradores. Os estágios curriculares não são exceção e isto foi bem visível quer na receção geral quer na equipa da QP&C. Aquando da chegada à Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA. é preparada uma receção por parte da equipa dos Recursos Humanos (RH) na qual são explicadas questões básicas de integração e funcionamento da empresa, sendo efetuada uma breve visita de apresentação nos escritórios. Após esta receção procede-se a atribuição de um tutor, responsável pelo acolhimento do novo colaborador e pela transmissão da cultura e dos valores da empresa. No caso do estágio curricular, o tutor acompanha o aluno durante toda a extensão do estágio, prestando apoio no desempenho das funções e em todas as questões necessárias.

À parte da integração habitual pela equipa dos RH, foi bastante positiva a integração na equipa da QP&C. Desde o início houve um ótimo acolhimento por parte de todos os colegas e da chefia, sempre atenciosos e disponíveis para ajudar e prestar apoio em todas as questões que foram surgindo. Destaco a importância da atribuição de um tutor dentro do

departamento, pelo auxílio que presta durante todo o estágio e a partilha de conhecimentos que se proporciona por estar mais próximo do aluno, fator que considero determinante para o meu estágio e para a minha formação.

Esta filosofia adotada pela Bluepharma acrescenta valor ao estágio em ambiente empresarial pois, para além de nos proporcionar a oportunidade de conhecer o mundo da Indústria Farmacêutica, fá-lo de uma forma simples e acolhedora, o que facilita a integração de um aluno estagiário, mas ao mesmo tempo sem distinção entre as admissões de novos colaboradores, o que oferece um sentimento de pertença e uma maior preparação para o futuro.

### **2.1.2 Mapeamento de processos**

A tarefa principal que realizei durante o estágio baseou-se no mapeamento dos processos de fabrico dos produtos produzidos pela Bluepharma. Consistiu na elaboração de fluxogramas simplificados do processo de fabrico de cada produto, com o objetivo de facilitar a visão geral do processo e das suas etapas por parte dos colaboradores, bem como o planeamento da produção. Esta tarefa permitiu-me o contacto com aplicativos de *softwares* tais como *Excel*, *Visio* e *ENNOV DOC*<sup>®</sup> e vários tipos de documentação relativa ao produto, como registos de fabrico elaborados pelo departamento da QP&C e o módulo 3.2.P.3 dos dossiers de AIM, correspondente ao fabrico, onde se incluem os seguintes pontos: Dados do fabricante; Fórmula de fabrico; Descrição do processo de fabrico e dos controlos em processo; Controlo das fases críticas e intermédias; Avaliação e/ou Validação do processo. [3]

A realização desta tarefa permitiu-me conhecer de forma prática e a nível industrial os processos de fabrico de formas farmacêuticas sólidas orais e as suas fases (Mistura de pós, Tamisação, Granulação Seca e Húmida, Encapsulação, Compressão e Revestimento), os diferentes equipamentos utilizados e deu-me autonomia para identificar passos críticos de várias fases dos processos.

Além das razões acima referidas, foi uma tarefa bastante positiva na medida em que permitiu de forma simples e rápida a familiarização com os produtos produzidos pela Bluepharma e quais os respetivos processos de fabrico.

### **2.1.3 Integração no Kaizen diário**

O Kaizen é um método criado em 1985 pelo grupo Toyota que tem como objetivo implementar culturas de melhoria contínua. Nesse sentido, o Instituto Kaizen presta apoio a organizações e empresas com vista a alcançar objetivos e vantagens competitivas (como o aumento de produtividade, rentabilização e motivação de recursos, eliminação de

desperdícios, redução de tempos de produção ou otimização de equipamentos). [4] Desde 2017 a Bluepharma tem vindo a implementar o método Kaizen em toda a organização com a criação de uma equipa de melhoria contínua que segue a filosofia Kaizen e que proporciona o envolvimento de todos os departamentos e colaboradores. Uma das ações prende-se com a implementação do *Daily Kaizen* que consiste na realização de reuniões diárias entre os líderes e as equipas, que visam criar uma rotina de planeamento de tarefas, de acompanhamento do progresso da atividade – através da análise de indicadores de desempenho – e de comunicação/identificação de problemas e de ações corretivas. Assim torna-se possível a aplicação mais autónoma do processo de melhoria contínua por parte das equipas. [5] Estas reuniões têm como suporte um quadro físico onde é representado o plano de trabalho do departamento, a lista de presenças, os objetivos a atingir e as suas prioridades, os indicadores de desempenho e a comunicação e resolução de problemas, através do ciclo PDCA (*Plan, Do, Check, Act*).

Para além de assistir às reuniões diárias do departamento da QP&C e ao processo de melhoria, foi possível integrar no *Daily Kaizen* um indicador de desempenho da tarefa que me estava incumbida, o que permitiu que os supervisores estivessem sempre informados do ponto da situação e facilitou a minha própria gestão da tarefa, possibilitando-me de forma mais intuitiva entender o funcionamento e o objetivo das reuniões. Além disso, tive a oportunidade de contactar com o *Daily Kaizen* e com os quadros físicos de outros departamentos, o que me permitiu conhecer diferentes formas de organização e de monitorização consoante o tipo de tarefas mais ou menos objetivas. O contacto com esta filosofia mostrou-se bastante positivo para o desenvolvimento das minhas competências de organização tanto a nível pessoal como profissional.

#### **2.1.4 Acompanhamento dos processos no terreno**

O facto da equipa da QP&C responsável pela Supervisão da Produção estar situada na área fabril permitiu-me o contacto diário não só com os operadores, bem como com as operações realizadas no terreno, o que me proporcionou uma visão mais prática do que é a atividade base de uma Indústria Farmacêutica. Foi bastante positivo pois foi possível conhecer na prática os processos de fabrico de formas farmacêuticas sólidas orais e ver aplicados conhecimentos teóricos que adquiri ao longo do curso. Além disso, permitiu-me ter um contacto próximo com os equipamentos usados nas diferentes fases dos processos e conhecer o seu funcionamento.

Ao acompanhar os diferentes processos tornou-se mais acessível a elaboração dos fluxogramas de fabrico, pois já tinha acompanhado na prática todos os processos que vim a

esquematizar, o que facilitou não só a minha compreensão dos processos, como a identificação dos passos mais críticos e dos obstáculos com os quais os colaboradores se deparavam no terreno aquando da execução dos processos e da interpretação da documentação.

Além disso, permitiu-me o contacto com vários colaboradores com diferentes níveis de formação e de experiência dentro da empresa, o que também contribuiu de forma bastante positiva para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

### **2.1.5 Integração na equipa da Qualidade na Supervisão da produção**

Para além da tarefa que me estava incumbida, tive a oportunidade de acompanhar a equipa da Qualidade na supervisão da produção nas suas funções diárias, onde presta apoio ao sector da fabricação no que diz respeito à qualidade do produto. A esta equipa da Qualidade compete assegurar o decurso normal dos processos de fabrico, em conformidade com a documentação do produto, as Boas Práticas de Fabrico e as normas internas. Assim, através do acompanhamento de diferentes estágios críticos dos processos, garante que qualquer desvio que possa ocorrer seja bem documentado e avaliado o seu impacto na qualidade do produto, sendo possível identificar em conjunto com a fabricação pontos a serem melhorados com o objetivo de aumentar a robustez e performance dos processos.

O acompanhamento das atividades diárias da equipa na área fabril permitiu-me pôr em prática e complementar os conhecimentos das Boas Práticas de Fabrico adquiridos durante o curso. Possibilitou também a melhor compreensão da importância do controlo dos processos e da avaliação do impacto que os desvios de fabrico poderão ter no produto acabado. Foi importante também a contactar com outros departamentos como a Fabricação e o Controlo de Qualidade para compreender a influência de existir uma boa articulação e comunicação entre departamentos.

Estar inserida na equipa da QP&C na Supervisão da Produção foi uma mais valia para a minha formação enquanto farmacêutica, contribuindo para o desenvolvimento da minha capacidade de análise e espírito crítico.

## **2.2 Fraquezas**

### **2.2.1 Duração do estágio**

A oportunidade prestada pela FFUC de realização de estágio em Indústria Farmacêutica revelou-se bastante vantajosa e enriquecedora.

No entanto, o tempo disponível para a realização do estágio revela-se escasso. Principalmente numa área tão vasta como a Indústria Farmacêutica, e sendo um ambiente completamente novo e pouco abordado ao longo do plano curricular, 3 meses são insuficientes para consolidar todos os conhecimentos adquiridos e ser autónoma no desempenho das funções.

Não descurando a oportunidade que se revelou excelente e muito vantajosa para o meu percurso, e reconhecendo a impossibilidade de uma duração mais alargada, considero uma fraqueza o facto de não nos ser possível ter mais tempo para a realização do estágio.

## **2.3 Oportunidades**

### **2.3.1 Ações de formação**

Ao longo do estágio foram realizadas várias ações de formação de integração na empresa em várias áreas, como por exemplo: Good Manufacturing Practises (GMP); Farmacovigilância; Higiene, Saúde e Segurança no trabalho; Assuntos Regulamentares; Sistemas de Informação e Melhoria Contínua.

Recebi também formação no sentido de me contextualizar na empresa e no departamento em que fui inserida. Iniciei com a leitura de procedimentos e normas (SOP's) com o objetivo de compreender as regras básicas e os procedimentos a adotar na área fabril e posteriormente a compreensão dos princípios e bases da atividade do departamento da QP&C. Além disso também me foi proporcionada formação com colaboradores do QP&C dos vários grupos de trabalho com o objetivo de conhecer todas as funções realizadas pelo departamento, dado ser um departamento multifacetado, que atua em várias etapas da atividade industrial.

Além desta formação de integração habitual, possível assistir a uma formação sobre Investigação de desvios (FDA's Investigating Deviations), acompanhar formações realizadas pela QP&C e destinadas aos operadores da fabricação sobre temas como Boas Práticas de Documentação e Contaminação cruzada e passar um dia no departamento de Controlo de Qualidade, em que recebi formação nas várias áreas do departamento, e em que pude



contactar com as técnicas laboratoriais efetuadas pelo departamento, tais como Dissoluções, HPLC e Microbiologia.

### **2.3.2 Visão geral do funcionamento da Indústria Farmacêutica**

O departamento da QP&C está encarregue da preparação de toda a documentação referente ao produto e por isso está envolvido na maior parte das etapas da atividade da indústria farmacêutica e do ciclo de vida do medicamento. O departamento está dividido em vários grupos de trabalho, como referido anteriormente, que estão envolvidos em diferentes etapas da atividade da indústria farmacêutica. Ao acompanhar e receber formação com os diferentes grupos ao longo do meu estágio, tive a oportunidade de contactar com as suas várias tarefas, conseguindo ter a perceção de processos envolvidos em várias fases do ciclo de vida do medicamento, desde a gestão dos sistemas de qualificação, calibração e validação de equipamentos, à preparação e análise da documentação analítica de matérias-primas e de produto semi-acabado, gestão da documentação e processos relativos à produção e embalamento, até à certificação de lotes, realização de relatórios referentes à qualidade dos produtos e gestão de reclamações técnicas. Além disso contactei com estes processos relativos a lotes piloto e comerciais, o que possibilitou o meu entendimento do processo e dos diferentes departamentos envolvidos.

Esta envolvimento do departamento permitiu-me não só entender melhor as funções e importância da área da Qualidade, mas também ter uma visão geral do funcionamento base da Indústria Farmacêutica – desenvolvimento e produção de medicamentos.

### **2.3.3 Auditorias externas**

Uma auditoria é um “*processo sistemático, independente e documentado para obter evidências de auditoria e respetiva avaliação objetiva, com vista a determinar em que medida os critérios da auditoria são satisfeitos.*” [6]

A Bluepharma é frequentemente sujeita a auditorias de segunda e terceira parte, por parte de clientes e de entidades reguladoras, respetivamente. Este facto revela os padrões de excelência da empresa, estando esta certificada por diversas entidades reguladoras que incluem o INFARMED, EMA, FDA DGAV, ANVISA, SFDA, Lybian Ministry of Health, Ministry of Public Health of Ivory Coast, e Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation. A submissão a auditorias de diversa natureza demonstra o empenho da empresa em identificar oportunidades de melhoria e estar constantemente atualizada e em concordância com os requisitos impostos por parte de entidades reguladoras e clientes.

Durante o período de estágio, decorreram duas auditorias externas de segunda parte. Apesar de não estar diretamente em contacto com a auditoria, ao estar integrada num dos departamentos que está mais intimamente relacionado com o processo, foi-me possível observar tarefas necessárias à preparação de auditorias bem como à sua dinâmica.

## **2.4 Ameaças**

### **2.4.1 Lacunas no plano curricular do MICF**

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas é bastante abrangente e envolve unidades curriculares de diversas áreas do domínio farmacêutico. Unidades curriculares como Tecnologia Farmacêutica, Assuntos Regulamentares e Gestão e Garantia da Qualidade são sem dúvida importantes para a aquisição de conceitos relacionados com a atividade da Indústria Farmacêutica. No entanto, as unidades curriculares mencionadas são insuficientes e lecionadas de forma isolada, o que leva a que o aluno inicie o estágio curricular na área sem a compreensão do funcionamento básico de uma Indústria Farmacêutica.

Com a frequência deste estágio esta dificuldade foi prontamente ultrapassada pela formação proporcionada e pelo apoio dos colegas, no entanto, entendo que os argumentos suprarreferidos permitiriam uma melhor preparação e maior facilidade na perceção de conceitos.

### **2.4.2 Áreas de estágio limitadas**

A diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013 [7], que altera a diretiva 2005/36/CE relativa ao reconhecimento das qualificações profissionais [8] menciona na secção 7 os pressupostos da obtenção do título de farmacêutico. Na sua sequência, o artigo 44, nº 2 prevê apenas 6 meses de estágio ao longo da formação em apenas duas áreas de atuação – Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar.

Contudo, a mesma diretiva descreve competências de um farmacêutico que não se enquadram nas áreas acima referidas, e a Ordem dos Farmacêuticos considera várias classes de especialidade da profissão de farmacêutico, designadamente: Análises Clínicas e Genética Humana, Assuntos Regulamentares, Farmácia Comunitária, Farmácia Hospitalar e Indústria Farmacêutica, e refere ainda outras saídas profissionais como Distribuição Farmacêutica ou Investigação Científica.

A consideração de mais áreas de estágio e a possibilidade de adequação do plano curricular às diferentes áreas do ato farmacêutico seria uma mais valia para a profissão. Apesar de a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporcionar esta oportunidade aos seus alunos, devido à lei e à forma como o curso está organizado, continua insuficiente o tempo disponibilizado para a aprendizagem e treino em ambiente real e para a sua adequação às perspetivas futuras dos alunos.

### **3. Considerações Finais**

A oportunidade facultada pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é sem dúvida excelente e de um enorme contributo para a formação de profissionais de excelência.

Estagiar na Bluepharma acrescentou valor aos 5 anos de Mestrado Integrado, possibilitando uma formação académica mais completa. A oportunidade de poder contactar com o ambiente empresarial e sobretudo numa empresa com valores tão elevados como a Bluepharma contribuiu para a minha valorização profissional, deixando-me mais preparada para o desempenho da minha profissão e para entrar no mercado de trabalho.

O balanço final foi bastante positivo, e creio que se deveu não só ao contacto com a Indústria Farmacêutica, mas também à integração nesta empresa e neste departamento, factos que contribuíram imenso para o meu crescimento profissional e pessoal.

A oportunidade de estar inserida no departamento da QP&C revelou-se bastante enriquecedora e possibilitou-me alargar horizontes, despertando o meu interesse pela área. No fim, considero ter retirado o melhor partido deste estágio e alcançado os objetivos propostos. Estagiar em áreas que vão para além da Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar é um passo dado na valorização da profissão e na melhoria da formação dos alunos. Certamente que esta experiência será um fator de relevância para o alcance de sucesso profissional.

## **Bibliografia**

- 1 - BLUEPHARMA. **Quem somos.** [Acedido a 1 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>.
- 2 - BLUEPHARMA. **Missão, visão e valores.** [Acedido a 1 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>.
- 3 - MQ4(RI). **The common technical document for the registration of pharmaceuticals for human use: quality – M4Q(RI).** ICH (2002).
- 4 - KAIZEN INSTITUTE. **Sobre o Kaizen Institute.** [Acedido a 24 de março de 2019]. Disponível em: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/kaizen-institute.html>.
- 5 - BASTOS, A. and SHARMAN, C. **Strat to Action.** (Kaizen Institute, 2018).
- 6 - NP 19011 (2012). **Linhas de orientação para auditorias a sistemas de gestão.** Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- 7 - Diretiva 2013/55/UE de 20 de Novembro de 2013. Jornal Oficial da União Europeia. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia.
- 8 - Diretiva 2005/36/CE de 7 de Setembro de 2005. Jornal Oficial da União Europeia. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia.

## *II - Relatório de estágio em Farmácia Comunitária*

*Farmácia Lusitana*  
*Orientado pelo Dr. José Carlos Osório Costa*

## **Resumo**

A etapa final do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas é um estágio curricular em Farmácia Comunitária.

Durante 4 meses realizei um estágio na Farmácia Lusitana onde experienciei a importância do papel do farmacêutico comunitário, tendo a oportunidade de aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de formação.

A análise desse percurso foi elaborada em formato SWOT, avaliando os pontos positivos e negativos que influenciaram o estágio.

**Palavras-chave:** Relatório de Estágio; Farmácia Comunitária; Análise SWOT

## **Abstract**

The final stage of the Integrated Master in Pharmaceutical Sciences is a curricular internship in Community Pharmacy.

For 4 months I did an internship at Farmácia Lusitana where I experienced the important role of community pharmacist, having the opportunity to apply and consolidate the knowledge acquired over the 5 years of training.

The analysis of this route was elaborated in SWOT format, evaluating the positive and negative points that influenced the stage.

**Keywords:** Internship Report; Community pharmacy; SWOT Analysis

## **Abreviaturas**

**SWOT** – Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats

**MICF** – Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

**USF** – Unidade de Saúde Familiar

**SNS** – Serviço Nacional de Saúde

**MNSRM** – Medicamentos não sujeitos a receita médica

## **I. Introdução**

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas engloba para além de uma formação teórico-prática obrigatória, um estágio curricular em Farmácia Comunitária, onde os alunos experienciam em ambiente real aquele que é um dos locais principais de atuação do farmacêutico.

Atualmente a Farmácia Comunitária é mais do que um local de dispensa de medicamentos, é um local de prestação de cuidados de saúde e promoção de bem-estar. A realização do estágio permitiu colocar em prática e consolidar conhecimentos técnico-científicos adquiridos ao longo do curso, assim como desenvolver competências adicionais que só seriam possíveis em contexto real. Desta forma, tive a oportunidade de compreender a importância do papel do farmacêutico comunitário e a importância da sua intervenção junto da comunidade. Mais do que um especialista do medicamento, o farmacêutico é um agente de saúde pública, e o contacto próximo com os utentes é de extrema importância para o aconselhamento e para a promoção da saúde.

O estágio foi realizado durante 4 meses na Farmácia Lusitana em Vila do Conde sob direção técnica da Dra. Sónia Vale e orientação do Dr. José Carlos Costa.

O presente relatório, elaborado tendo por base uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) diz respeito às atividades realizadas durante o estágio com base nas competências adquiridas no decurso do Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, bem como ao enquadramento deste na realidade profissional. Representa uma análise crítica das Forças e Fraquezas (ambiente interno) e as Oportunidades e Ameaças (ambiente externo) que influenciaram o estágio.



## 2. Análise SWOT

Tabela 2 - Quadro resumo da análise SWOT

	<i>Fatores positivos</i>	<i>Fatores negativos</i>
<i>Ambiente interno</i>	<b>Forças</b> Localização e população abrangida Variedade de produtos e serviços Laboratório de medicamentos manipulados Indicação e intervenção Farmacêutica	<b>Fraquezas</b> Receituário manual Lacunas no plano curricular do MICEF
<i>Ambiente externo</i>	<b>Oportunidades</b> Iniciativas junto da comunidade Ações de formação Novo módulo de atendimento do Sifarma	<b>Ameaças</b> Competências de comunicação

### 2.1 Forças

#### 2.1.1 Localização e população abrangida

A Farmácia Lusitana tem uma localização privilegiada no centro da cidade e próxima da USF, clínicas e consultórios médicos de várias especialidades. As boas acessibilidades associadas a um horário alargado são motivos de grande afluência de utentes à farmácia. Para além do elevado afluxo de clientes habituais, maioritariamente idosos, os meses de verão trazem um aumento de afluência de clientes esporádicos – emigrantes e turistas – pelo facto de Vila do Conde ser um destino de férias. Além disso, por estar junto à rota do Caminho de Santiago, é frequente a afluência de turistas de outras nacionalidades.

Esta heterogeneidade de utentes com características e necessidades diversas revelou-se vantajosa e desafiante obrigando a uma adaptação constante do discurso (inclusive ao idioma do utente em questão), da postura e do atendimento em si e também de um elevado conhecimento científico, pois somos confrontados com questões das mais diversas áreas.

#### 2.1.2 Variedade de produtos e serviços

A Farmácia Lusitana prima pela preocupação de ser encarada como um espaço de saúde e bem-estar. Sendo uma farmácia grande e com elevada diversidade de utentes, é crucial

que a oferta de produtos seja também diversa de forma a permitir uma capacidade de resposta eficaz às necessidades dos utentes. Assim, a Farmácia Lusitana tem uma oferta bastante variada a nível de produtos e serviços.

Com o foco principal nos medicamentos, a farmácia dispõe de uma grande variedade de stock de MSRM e produtos de venda livre. Além disso, tem uma oferta variada de serviços farmacêuticos – medição de tensão arterial, realização de testes bioquímicos, administração de injetáveis, sessões de nutrição e consultas de podologia – grande variedade de produtos de ortopedia, medicamentos manipulados e produtos de nutrição clínica e suplementação alimentar. Aposta também em produtos das mais diversas áreas de bem-estar, com uma vasta gama dermocosmética, puericultura e perfumaria.

Esta variedade de serviços e produtos é uma mais valia para a farmácia pois atrai diversos tipos de utentes e traduziu-se também numa mais valia para o meu estágio, por me proporcionar a oportunidade de contactar com a variedade de serviços e produtos, aumentando o meu conhecimento e desenvolvendo as minhas capacidades de aconselhamento farmacêutico.

### **2.1.3 Laboratório de medicamentos manipulados**

Segundo o Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de Abril, um medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. O mesmo define fórmula magistral como o medicamento preparado segundo receita médica que indica o doente a que se destina; e preparado oficial o medicamento que é preparado segundo as indicações de uma farmacopeia ou formulário. [1]

Como referido anteriormente, uma das grandes apostas da Farmácia Lusitana é o laboratório de medicamentos manipulados, estando esta atividade a cargo de um elemento da equipa. Durante o estágio tive a oportunidade de acompanhar e auxiliar diversas vezes o processo de preparação. Deste modo, aprendi e consolidei conceitos de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. Foram-me transmitidos diversos conceitos relacionados com a prática, como as regras de prescrição, o cálculo do preço, as regras de rotulagem, o cálculo do prazo de validade e as etapas a seguir para dar início à preparação – como a criação da ficha de preparação do produto – alguns dos quais se encontram identificados no Anexo I.

### **2.1.4 Indicação e intervenção Farmacêutica**

Como já foi atrás referido, durante o tempo dispensado para o atendimento ao balcão tive a oportunidade de contactar com um público bastante heterogéneo com necessidades

distintas. Neste sentido, deparei-me com diversas situações em que era solicitado o aconselhamento farmacêutico.

Ao estar sozinha com o utente, tive que desenvolver a capacidade de escutar para compreender as suas necessidades de forma a poder fazer um aconselhamento adequado. A capacidade de ouvir, entender e responder utilizando uma linguagem adequada ao utente é a base para a construção de uma relação de confiança.

Considero esta fase de interação com o utente um ponto forte no meu desenvolvimento enquanto farmacêutica. Apesar de desafiante e exigente, é compensador ter um utente que vai para casa confiante no atendimento que lhe fizemos e que volta satisfeito, ganhando confiança em nós. No caso de um estagiário torna-se mais importante e difícil alcançar esta confiança, pela inexperiência inerente. A capacidade em demonstrar uma postura calma e confiante é essencial neste caso, pois transmite a mesma sensação ao utente.

Assim, contactei com diversos casos que contribuíram para aperfeiçoar as minhas capacidades de aconselhamento e intervenção farmacêutica, como descrito no anexo II, desenvolvendo as minhas competências na resolução de problemas que permitiram a consolidação de conhecimentos em diversas áreas.

## **2.2 Fraquezas**

### **2.2.1 Receituário manual**

Atualmente a maioria das receitas são emitidas por via eletrónica, o que veio agilizar o processo de atendimento, permitindo aumentar o foco e atenção no utente. No entanto, ainda é frequente o aparecimento de receitas manuais. Esta via de prescrição pode ser utilizada obedecendo a certas exceções, sendo elas: falência do sistema informático, inadaptação do prescriptor, prescrição ao domicílio e outras situações até um máximo de 40 receitas por mês. [2] Estas receitas requerem uma validação prévia pelo farmacêutico no momento da dispensa, desviando o foco inicial no utente. A validação inclui os seguintes aspetos: razão da utilização da via manual; presença da vinheta identificativa do médico e, se aplicável, do local de prescrição; nome e número de utente; assinatura do prescriptor; denominação internacional comum da substância ativa; máximo de quatro produtos por receita e de dois por cada linha; validade de um mês e identificação do regime de comparticipação especial, se aplicável. [2] A estes pontos acrescenta-se a verificação da existência de descontos, portarias e regimes de comparticipação fora do SNS. Durante a realização do meu estágio, ocorreu uma alteração para um novo modelo de receita médica, invalidando o modelo anteriormente em vigor. Esta

alteração traduziu-se numa atenção redobrada, sendo necessário a identificação da validade dos modelos de receita anteriormente em vigor.

Esta necessidade de validação, associado à ausência de verificação pelo sistema informático dos produtos a dispensar, torna o processo mais demorado e aumenta o risco de erro no momento da dispensa. Nesse sentido, torna-se numa dificuldade acrescida para o aluno estagiário.

### **2.2.2 *Lacunas no plano curricular do MICF***

O plano curricular do MICF é bastante abrangente cobrindo na generalidade a maior parte das áreas de atuação farmacêutica. Havendo um foco considerável na preparação dos alunos para a área de farmácia comunitária, continuam a existir algumas lacunas na formação. Apesar da variedade de unidades curriculares e de algumas com bastante especificidade e que proporcionam uma importante preparação para a área de farmácia comunitária, certas áreas ficam aquém das expectativas. Áreas como Nutrição Clínica e Preparações de Uso Veterinário deixam por explorar temas que se revelam pertinentes em contexto prático. No caso da nutrição e suplementação alimentar fica a faltar uma significativa vertente de indicação farmacêutica, sendo uma área que exige um elevado conhecimento e atenção do farmacêutico, principalmente dada a grande oferta de produtos existentes no mercado. Para além disso, a área de dermofarmácia e cosmética também beneficiaria de uma complementação mais direcionada para as afeções cutâneas mais comuns que normalmente são resolvidas recorrendo apenas à intervenção farmacêutica.

Estas foram as vertentes em que senti maior grau de dificuldade pois a maioria das situações requer uma indicação farmacêutica para a qual um aluno estagiário não se encontra tão bem preparado. De notar que estas dificuldades foram ultrapassadas com apoio dos membros da equipa.

## **2.3 *Oportunidades***

### **2.3.1 *Iniciativas junto da comunidade***

A Farmácia Lusitana destaca-se pela proximidade e preocupação com os utentes, efetuando várias iniciativas de promoção da saúde e bem-estar junto da população. Durante o meu estágio tive a oportunidade de participar em duas dessas iniciativas.

No mês de Maio, mês do coração, foi organizado um rastreio cardiovascular – medição de colesterol, glicémia e tensão arterial – que decorreu em todas as sextas-feiras do mês. Esta

iniciativa teve bastante sucesso junto da população e contou com a participação dos membros mais recentes da equipa, onde eu estava incluída. Ter a oportunidade de participar foi um ponto forte do meu estágio e da minha formação pois permitiu-me um contacto mais próximo com os utentes num ambiente diferente do habitual, em que não estava implicada uma venda, mas apenas a promoção e preocupação com a sua saúde. Além disso, por ter acontecido antes de ter iniciado as funções ao balcão, tornou-se o primeiro contacto que tive com os utentes, sendo um passo importante para o desenvolvimento das minhas capacidades de comunicação.

A outra iniciativa que tive a oportunidade de acompanhar foi uma formação junto de alunos do 1º ciclo sobre cuidados de proteção solar. Foi feita uma apresentação a duas turmas do 3º ano da Escola Básica nº1 de Vila do Conde, em que foram partilhados com os alunos os cuidados a ter com o sol, a importância da proteção solar e como intervir em caso de queimaduras solares. A apresentação foi bastante interativa, com um feedback muito positivo dos alunos e tornou-se também uma experiência muito importante e enriquecedora para mim e para o meu desenvolvimento enquanto profissional.

### **2.3.2 Ações de formação**

Na área da saúde e em especial na farmácia comunitária é importante haver valorização profissional contínua. Constantemente há avanços científicos na área da saúde e o lançamento de produtos inovadores, sendo dever do farmacêutico manter-se atualizado para proporcionar um aconselhamento completo e bem fundamentado.

Ao longo do estágio, além da constante partilha de conhecimentos pelos colegas, tive a oportunidade de assistir a várias formações em diversas áreas de atuação, como dermofarmácia, suplementação alimentar, MNSRM e dispositivos médicos, as quais se encontram descritas na Tabela 3.

Além destas, foi possível assistir a formações sobre dois novos serviços farmacêuticos que foram introduzidos na farmácia: serviço de podologia e consultas de cessação tabágica, adquirindo bases para uma boa promoção do serviço e aconselhamento do utente.

Estas formações revelaram-se uma oportunidade de colmatar algumas lacunas do plano curricular acima referidas, concedendo-me uma maior autonomia e confiança no desempenho das minhas funções.

**Tabela 3 – Formações assistidas no âmbito do estágio curricular em farmácia comunitária**

<b>Área</b>	<b>Entidade formadora</b>	<b>Cariz da formação</b>
<b>Dermofarmácia</b>	Uriage®	Iº Curso Uriage
	Laboratório BIODERMA®	Apresentação da gama Photoderm
<b>Suplementação alimentar</b>	Nestlé Health Science®	Suplementos alimentares e nutrição clínica
	Gold Nutrition®	Suplementação desportiva
<b>MNSRM</b>	Alcon®	Tratamento da síndrome do olho seco – apresentação da gama Systane
<b>Produtos de bem-estar</b>	Perrigo®	Apresentação da parceria com a Colgate e das novas soluções para afeções bucodentárias
<b>Dispositivos médicos</b>	Ascendia®	Apresentação dos novos medidores Contour® Next One

### **2.3.3 Novo módulo de atendimento do Sifarma**

Um dos pontos que considero ter influenciado de forma positiva o meu estágio foi a oportunidade de poder utilizar o novo módulo de atendimento do Sifarma.

Este módulo apresenta um layout mais moderno, mais intuitivo e, portanto, mais simples. Inclui funcionalidades que tornam o atendimento mais simples e fluido, como por exemplo a possibilidade de andar para trás em qualquer momento do atendimento, dividir faturas por utentes dentro do mesmo atendimento e identificar o utente e o utente pagador, para os produtos ficarem associados à pessoa correta.

Apesar de ainda apresentar algumas falhas e de haver um caminho a percorrer na otimização do novo módulo, considero que foi uma ferramenta importante para o meu trabalho. Por ser mais moderno e intuitivo facilitou a minha adaptação e representa também um fator positivo para a modernização da profissão, havendo cada vez mais a necessidade de acompanhar o avanço das tecnologias.

## **2.4 Ameaças**

### **2.4.1 Competências de comunicação**

Como referido anteriormente, o plano curricular do MICF apresenta algumas lacunas que se traduzem em dificuldades durante o estágio.

A falta de uma componente prática em ambiente simulado de farmácia comunitária constitui na minha opinião uma ameaça para os alunos. Apesar de sermos confrontados com o ambiente real com uma base significativa de background científico, ao longo do curso nunca somos confrontados com a necessidade de aprender competências comportamentais e de comunicação. A farmácia comunitária é uma área em que há um constante contacto com os utentes e que é bastante próximo, sendo muitas vezes o primeiro local a que os utentes recorrem. Não raras vezes somos deparados com situações complicadas e delicadas em que há necessidade de adaptar o discurso em função da situação. No entanto ao longo do curso não temos nenhum tipo de formação nesse sentido.

A existência de uma componente prática que desenvolvesse estas competências traria uma mais valia considerável para os alunos e consequentemente melhores profissionais.

### **3. Considerações Finais**

Com o estágio curricular os alunos têm a possibilidade de colocar em prática os conhecimentos técnico-científicos adquiridos ao longo dos 5 anos de formação e consolidá-los.

Este estágio foi bastante positivo e foi uma experiência fulcral para o meu desenvolvimento profissional, pois tive a oportunidade de, além de aplicar conhecimentos técnicos adquiridos ao longo do curso, desenvolver competências que apenas são possíveis adquirir quando se contacta com a realidade profissional. Esta aprendizagem prática é crucial para a prestação de um serviço de qualidade, centrado no utente e nas suas necessidades.

O farmacêutico, é um especialista do medicamento, e um agente de saúde pública, tendo um papel importante no bem-estar do utente e na promoção da saúde. No entanto, há ainda um longo caminho a percorrer no reconhecimento e na valorização do ato farmacêutico.

Agradeço à equipa da Farmácia Lusitana pois foi determinante para a minha aprendizagem e é um exemplo do reconhecimento e da valorização do ato farmacêutico, e do impacto que o farmacêutico tem na qualidade de vida dos utentes.



## **Bibliografia**

- 1 - Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de Abril. Diário da República: I-A Série, no 95. Ministério da Saúde. 2004.
- 2 - Portaria n.º 224/2015, de 27 de Julho. Legislação Farmacêutica Compilada. Ministério da Saúde. 2015.
- 3 - INFARMED, I.P.. **Resumo das Características do Medicamento, Pandermil 10mg/g creme.** [Acedido em 27 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://app7.infarmed.pt/infomed/>
- 4 - INFARMED, I.P.. **Resumo das Características do Medicamento, Caladryl Suspensão Cutânea.** [Acedido em 27 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://app7.infarmed.pt/infomed/>
- 5 - INFARMED, I.P.. **Resumo das Características do Medicamento, Zyrtec 10mg comprimidos revestidos por película.** [Acedido em 27 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://app7.infarmed.pt/infomed/>
- 6 - ZTOP. **Estudo técnico.** [Acedido em 27 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://www.ztop.pt>

# Anexo I

## Exemplo de ficha de preparação e rótulo de medicamentos manipulados – Solução de Minoxidil a 5%

O minoxidil a 5% é utilizado no tratamento da alopecia androgénica e alopecia areata, sendo destinado a tratamento tópico duas vezes por dia.

### FARMÁCIA LUSITANA



Praça Luís de Camões, 20  
4480-719  
Telef: 252633133  
Director Técnico: Dra. Sónia Vale

### **Solução de Minoxidil a 5%**

Quant Dispensada:

1 X 100,00 ml

PVP: 15,00 €

Teor: Minoxidil 50 mg/mL

**Aplicação: USO EXTERNO**

Posologia : Aplicar até 2 vezes por dia.

Advertencia : Não ingerir. Manter fora do alcance das crianças.

Conservação: Conservar no recipiente bem fechado, em local fresco e seco.

Preparado em: 29/07/2019

Usar até: 25/01/2020

Lote Nr: FL-4784



### Ficha de Preparação do Manipulado

#### Solução de Minoxidil a 5%

Cliente:

Forma Farmacêutica: SOLUÇÃO  
 Data de Preparação: 29/07/2019 Prazo Validade : 25/01/2020  
 Nº Lote : FL-4784 Registo Copiador : 4.785  
 Condições de Conservação : Conservar no recipiente bem fechado, em local fresco e seco.  
 Posologia: Aplicar até 2 vezes por dia.  
 Qtd. Total Medicamento : 1 X 100,00 ml  
 Director Técnico : Dra. Sónia Vale  
 Operador : Dr. Jorge Rodrigues  
 Médico:

Honorários: 5,03 €  
 Factor Multiplicativo: 3,00

Valor Net : 24,69 €  
 Valor IVA : 1,48 €  
**Valor Total: 26,17 €**

**Valor PVP**  
**15,00 €**

Matérias Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid	Preço Aq. s/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima
Minoxidil	5 g	13799/50/	Farma-Química	5,00	g	0,15 €	2,20	1,60 €
Propilenoglicol	25,9 g	180978-P-	Acofarma	25,00	ml	0,01 €	1,90	0,33 €
Água Purificada	15 g	0086095	Guinama	15,00	ml	0,00 €	1,90	0,06 €
Álcool a 96°	44,55 g	19/0510	Manuel Vieira e	55,00	ml	0,00 €	1,90	0,10 €
Glicerina	6,5 g	0083184	Guinama	5,00	ml	0,01 €	2,20	0,07 €
<b>Subtotal</b>								<b>2,16 €</b>

Preparação
Verificar o estado de limpeza de todo o material e das bancadas a utilizar.
Pesar e misturar em copo de diluição de tamanho adequado, previamente tarado, a água, a glicerina, o propilenoglicol e 2/3 do volume de etanol a 96% (V/V).
Aquecer a mistura em banho de água (50 - 60 °C) e dissolver o minoxidil, sob agitação magnética.
Após arrefecimento total, transferir para balão volumétrico de tamanho adequado, previamente tarado, completar com o restante etanol a 96% (V/V) e filtrar a solução.
Acondicionar o produto semi-acabado em embalagem adequada e rotular.
Lavar todo o material e as bancadas utilizados com álcool a 70% e secar.

Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac	Qtd	Preço	Fact. Mult.	Valor Net
Frasco vaporizador cilíndrico	EMBAL	2019-447	Fagron	125 ml	1,00	1,45 €	1,20	1,74 €
<b>Subtot</b>								<b>1,74 €</b>

Ensaio	Especificação	Conforme	Utilizador	Assinatura
Cor	Incolor		Dr. Jorge Rodrigu	
Odor	Álcool		Dr. Jorge Rodrigu	
Aspecto	Límpida e transparente		Dr. Jorge Rodrigu	
pH	8,0 - 9,5		Dr. Jorge Rodrigu	
Quantidade	100 mililitros		Dr. Jorge Rodrigu	

/ /  
(Data)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

## Anexo II

### Caso Prático – Indicação farmacêutica

Uma utente dirigiu-se à farmácia referindo que a filha adolescente apresentava várias de picadas de mosquito e que precisava de um creme para acalmar a comichão que não fosse o Fenistil®, pois já tinha aplicado e não surtia efeito.

Após conversar com a utente e no seguimento de algumas perguntas, certifiquei-me que a filha não tinha problemas de saúde e percebi que a área afetada era grande e que as pápulas estavam bastante inflamadas.

Considerando a ineficácia do Fenistil®, procurei uma alternativa tópica que pudesse aliviar os sintomas. Como a área afetada era considerável e incluía zonas da pele mais sensíveis, foi descartada a hipótese de aplicar uma hidrocortisona tópica devido ao risco aumentado de absorção sistémica. [3] Aconselhei então a aplicação de Caladryl Loção® na área afetada, pela conjugação da ação anti-histamínica com a ação analgésica da cânfora e as propriedades adstringentes e protetoras da calamina. [4] Sugeri também a toma de um anti-histamínico oral caso a ação tópica não fosse suficiente, aconselhando uma toma diária de Cetirizina 10mg. [5] Sensibilizei a utente para a importância da prevenção, visto esta ter referido que se tratava de uma situação recorrente, e sugeri a utilização de repelentes para evitar que a situação ocorresse, mostrando-lhe as gamas de produtos em spray e as pulseiras repelentes de mosquitos, optando a utente pela pulseira da Ztop®, impregnada com permetrina que é ativada após o primeiro contacto com a água e cujo efeito repelente tem duração de um mês. [6]

### *III – Monografia*

*To explore the use of a BH3-mimetic (ABT-737) as a chemosensitizer of osteosarcoma cells to doxorubicin*

*Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra  
Orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Cruz Rosete*

## **Abstract**

Osteosarcoma is the most common pediatric bone malignance. It a heterogeneous tumor with a complex hierarchy characterized by genetic instability. The high recurrence and resistance to conventional chemotherapy is a major concern in osteosarcoma treatment. The study of new therapeutic approaches is important in order to overcome drug-induced resistance and toxicity.

Resistance to therapy can occur by several mechanisms, including resistance to apoptosis. Balance between anti and pro-apoptotic proteins from the Bcl-2 family plays an important role in the regulation of apoptosis, and its normally altered in cancer cells, resulting in an important mechanism of resistance. BH3-mimetics are a novel class of drugs that induce apoptosis by blocking the anti-apoptotic proteins, releasing the pro-apoptotic proteins for oligomerization. In this study, we evaluate the effect of a BH3-mimetic ABT-737 on sensitizing osteosarcoma cells to doxorubicin-induced apoptosis.

Cells from two human osteosarcoma cell lines MNNG/HOS and MG-63 were treated with doxorubicin and ABT-737 and evaluated its effects on cell viability, apoptosis induction and expression of pluripotency related genes.

ABT-737 was effective against both osteosarcoma cell lines and potentiated the effects of doxorubicin-induced apoptosis through a synergic manner.

Although preliminary, our data suggest that co-treatment with ABT-737 can be considered as a new therapeutic strategy for overcoming resistance to doxorubicin-induced apoptosis in osteosarcoma.

**Keywords:** osteosarcoma, apoptosis, doxorubicin, BH3-mimetics, synergy.

## Resumo

O osteossarcoma é a neoplasia óssea pediátrica mais comum. É um tumor heterogêneo com uma hierarquia complexa caracterizada pela sua instabilidade genética. A sua elevada recorrência e resistência à quimioterapia convencional são a principal preocupação no que toca ao tratamento do osteossarcoma. O estudo de novas abordagens terapêuticas é importante para superar a resistência e a toxicidade induzidas por pela quimioterapia.

A resistência à terapia pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo a resistência à apoptose. O equilíbrio entre as proteínas pró e anti-apoptóticas da família das Bcl-2 desempenha um papel importante na regulação da apoptose e, normalmente, está alterado nas células cancerígenas, resultando num importante mecanismo de resistência. Os fármacos miméticos do BH3 são uma nova classe de medicamentos que induzem a apoptose, bloqueando as proteínas anti-apoptóticas. Neste estudo, avaliamos o efeito de um BH3-mimético ABT-737 na sensibilização de células de osteossarcoma à apoptose induzida pela doxorrubicina.

As células de duas linhas celulares humanas de osteossarcoma MNNG/HOS e MG-63 foram tratadas com doxorrubicina e ABT-737 e avaliados os seus efeitos na viabilidade celular, indução de apoptose e expressão de genes relacionados com pluripotência.

O ABT-737 foi efetivo em ambas as linhas celulares de osteossarcoma e potenciou os efeitos da apoptose induzida pela doxorrubicina de forma sinérgica.

Embora preliminares, os nossos resultados sugerem que o co-tratamento com o ABT-737 pode ser considerado como uma nova estratégia terapêutica para ultrapassar a resistência à apoptose induzida pela doxorrubicina no osteossarcoma.

**Palavras-chave:** osteossarcoma, apoptose, doxorrubicina, BH3-mimético, sinergia.

## **List of Abbreviations**

- 7AAD** – 7-Aminoactinomycin D
- AI** – Bcl-2-related protein AI
- ABC** – ATP-binding cassette
- ATP** – Adenosine Triphosphate
- Bad** – Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2-associated death promoter
- Bak** – Bcl-2 antagonist killer 1
- Bax** – Bcl-2-associated X protein
- Bcl-2** – B-cell lymphoma protein 2
- Bcl-w** – Bcl-2-like-protein-2
- Bcl-xL** – Bcl-L related protein, long isoform
- BH** – Bcl-2 homology domain
- Bid** – Bcl-2-interacting domain
- Bim** – Bcl-2-interacting mediator of cell death
- CI** – Combination index
- CIS** – Cisplatin
- CSC** – Cancer stem cells
- DHF** – Dihydrofolate
- DHFR** – Dihydrofolate reductase
- DMSO** – Dimethyl sulfoxide
- DNA** – Deoxyribonucleic Acid
- DOX** – Doxorubicin
- FITC** – Fluorescein isothiocyanate
- HDMTX** – High-dose methotrexate
- IC50** – Concentration of drug needed to inhibit cell proliferation by 50%
- MAP** – Standard combination therapeutics for osteosarcoma (high-dose methotrexate, doxorubicin and cisplatin)
- Mcl-1** – Myeloid cell leukemia sequence 1
- MDR** – Multi drug resistance
- MOMP** – Mitochondrial outer membrane permeabilization
- MSC** – Mesenchymal stem cell
- MTT** – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- MTX** – Methotrexate
- NMR** – Nuclear magnetic resonance



**NOXA** – phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1  
**OS** – Osteosarcoma  
**p53** – p53 tumor suppression protein  
**PCR** – Polymerase chain reaction  
**pRb** – Retinoblastoma protein  
**PS** – Phosphatidylserine  
**PUMA** – p53 upregulated mediator of apoptosis  
**RBI** – Retinoblastoma gene  
**RNA** – Ribonucleic acid  
**ROS** – Reactive Oxygen Species  
**RPMI** – Roswell Park Memorial Institute (Medium)  
**RT** – Reverse transcriptase  
**SEM** – Standard error of mean  
**THF** – Tetrahydrofolate  
**TP53** – p53 tumor suppressor gene

## **List of Tables**

Table 2.1 – Drug concentrations used in the MTT reduction assay.....	53
Table 2.2 – Drug concentrations used on the flow cytometry-based apoptosis assay.....	54
Table 2.3 – Primer sequences used to perform RT-qPCR analysis.....	57

## **List of Figures**

Figure 1.1 – Molecular mechanisms involved in resistance to chemotherapeutics. ....	47
Figure 1.2 – Interactions between Bcl-2 family members and BH3-mimetic to initiate apoptosis. .....	50
Figure 3.1 – Effects of DOX on viability of (A) MG-63 and (B) MNNG/HOS cell lines after 48h incubation. ....	58
Figure 3.2 – Effects of ABT-737 on viability of MG-63 and MNNG/HOS cells after 48h incubation. ....	59
Figure 3.3 – Percentage of viable cells for (A) MG-63 and (B) MNNG/HOS cell lines after 48h treatment with DOX and ABT-737 alone and in combination at a fixed ratio of 1:5.....	60
Figure 3.4 – Effects of ABT-737 on apoptosis induction in MG-63 cells after 48h incubation. ....	61
Figure 3.5 – Effects of DOX and ABT-737 alone and combined on apoptosis induction of (A) MG-63 cells and (B) MNNG/HOS cells after 48h incubation.....	62
Figure 3.6 – Effects of DOX and ABT-737 alone and in combination on apoptosis induction in (A) MG-63 cells and (B) MNNG/HOS cells after 48h incubation. ....	63
Figure 3.7 – Relative expression of OCT4, SOX2 and KLF4 in MG-63 and MNNG/HOS cell lines. ....	64

# **I. Introduction**

## **I.1 Osteosarcoma**

### **I.1.1 Etiology and Epidemiology**

Osteosarcoma (OS) is a bone tumor characterized by spindle cells of mesenchymal origin depositing immature osteoid matrix. [1] Although bone tumors are rare (with an incidence of 3-5% in children and less than 1% in adults) osteosarcoma is the most common one. [2]

It has a bimodal incidence, with a peak in puberty, followed by a plateau in the adult age (25-60years) and another lower peak after 60 years. [1] It is the most common primary bone tumor on children and adolescents, representing 5% of pediatric malignances. [3] It is estimated to have a global incidence of 3-4.5 cases/million population/year in children and 1-4.5 cases/million population/year in elderly. [4]

Primary osteosarcoma can occur in any bone, but it is more frequent in distal femur (30%), proximal tibia (15%) and proximal humerus (15%). In the long bones it is normally localized in the metaphysis of the bone and arises as an enlarging and palpable mass, complemented with progressive pain. [5]

To the present date, there is not enough information to establish a recurrent genetic event that leads to the occurrence of OS, however, there are some factors and syndromes that appear to be related with the predisposition to the development of OS. [1,5]

Although there's some inconsistency in the literature, there seems to be a relation between tall stature and the appearance of OS. The hypothesis was described for the first time by Fraumeni *et al.* after analysis of epidemiological data and over the years several studies were performed to try to establish the relation. [6] Due to the low prevalence of the tumor it is difficult to have a significative number of samples for a statistical relevant analysis, however, there are some meta-analysis confirming this relationship and also providing data that high birth-weight may also be a risk factor to the appearance of OS. [7]

One of the factors that seems to be related in adolescent patients is the hormonal changes in puberty and the rapid growth of bones at this age, based on the fact that OS is more frequent to occur in metaphysis of lower extremity long bones, like distal femur or proximal tibia. [1,4]

Li-Fraumeni syndrome is an autosomal dominant syndrome frequently associated with several types of cancer, including osteosarcoma. Its characterized by germline mutations in

TP53 tumor suppressor gene with somatic loss of p53 function. Its estimated that 15-30% of patients with Li-Fraumeni syndrome develop osteosarcoma. [1,8] Somatic mutations of the gene are also found in sporadic OS. [1]

Retinoblastoma is another autosomal dominant disease frequently associated with OS. It causes malignant eye tumors in children and increases the risk of develop soft tissue sarcomas, melanoma, brain tumor and, more commonly, osteosarcoma. [9] It is associated with a germline mutation in the RB1 tumor suppressor gene, that fails to encode the retinoblastoma protein (pRb). [1] The pRb is essential in the regulation of the cell cycle. It acts by binding to the transcription factor E2F when there's DNA damage, preventing the cell to proceed through G1/S phase. [8,10]

In the elderly, it normally occurs as a secondary neoplasm and its associated with Paget disease, other benign bone disease associated to previous radiation exposure. [1] Paget disease it's a hereditary metabolic bone disease characterized by rapid bone remodeling caused by a deregulation in the osteoblastic lineage, leading to an abnormal bone formation. It affects mostly older people, and 1% of the patients with Paget disease develop OS, representing the majority of the OS cases over 60 years old. [4,11]

### ***1.1.2 Pathogenesis and cells-of-origin***

Osteosarcoma is a heterogeneous tumor characterized by a complex hierarchy and genetic instability. Giving the fact that the location and period of arising are consistent with rapid skeleton growth, it is less likely that the malignant manifestations develop due to a slow response to carcinogenic hits over time, like it happens with other types of cancer. This period when the bone progenitor cells are active seem to support the theory of the development of a malignant phenotype during the proliferation and differentiation programming, leading to an urge to identify a cell-of-origin for OS. [12]

Over the years there has been intensive investigations in this field, leading to the proposal of two different theories, although none is completely clarified yet. The theories are based in two different models: the mesenchymal stem cell (MSC) model and de osteoblastic committed cell model.

Osteosarcoma is divided in different subtypes that produce different types of matrix whose classification is based on the histological analysis: osteoblastic, chondroblastic and fibroblastic – the most common ones – and another less common subtypes like telangiectatic and giant-cell rich and small cell. [5,13] This variety of histologic types and the heterogeneity of cell types supports the hypothesis that the MSC could to be potential cells of origin, giving their multipotential differentiation capacity and also their role in the normal bone remodeling.

[14] Studies using MSC both *in vivo* and *in vitro* show their capacity to induce OS, although it normally originates a poorly differentiated tumor. Pursuing this hypothesis, several groups showed that genetic alterations mainly in the p53 and RB1 genes influence the capacity of MSC to originate OS, and although they have a low incidence, they have the capacity to initiate OS, probably also influenced by the microenvironment. [5,13]

Other studies support the theory that OS originates from a population of cells that undergo osteoblast commitment, instead of immature MSC. [5] *In vivo* studies using murine models show higher incidence of OS originated from osteoblastic committed cells than from MSC, and with a higher stage of differentiation. The penetration is higher when preosteoblastic cells are targeted to transformation, along with deletion of p53, RB1 and NOTCH inactivation. Mutsaers *et al.* suggest that the stage of differentiation on the osteoblastic lineage determines the OS subtype.

Based on these studies, it seems more likely that OS arises from a more differentiated osteoblast cell than from MSC, giving the fact that the more immature the cell population is, less probability for OS to arise experimentally. [13]

## **1.2 Therapeutic approaches**

Before the use of chemotherapy, OS was treated with surgical amputation of the affected member, but most patients succumbed with one year with aggressive pulmonary metastasis. In the 1980's, clinical trials showed that the use of chemotherapeutics improved the patient's prognosis, showing an increase in 6-year survival rate from 11 to 61%, which led to the introduction of multi-agent chemotherapy as the standard treatment for the OS. [1,15]

The standard treatment for the non-metastatic osteosarcoma is the combination of high-dose methotrexate, doxorubicin and cisplatin (MAP) along with surgical removal of the tumor. Patients are treated with 2 cycles of neoadjuvant MAP during ten weeks before the surgery. Adjuvant treatment is initiated within 3 weeks following the surgical removal, with various cycles of MAP administered in the course of 29 weeks. [16] Both tumor and metastases should be removed with wide margins, since surgery continues to be critical for the remission of the tumor and to prevent recurrence. A histological analysis of the tumor mass is used to evaluate the effect of the neoadjuvant chemotherapy. A necrosis rate higher than 90% is considered a good treatment response and indicates a good prognosis. This histologic analysis may also be used to guide the adjuvant therapy. [1]

### **1.2.1 Doxorubicin**

Doxorubicin (DOX) is the central chemotherapeutic drug used in the treatment of OS. It is a non-selective class I anthracycline [17] first isolated from the bacteria *Streptomyces peucetius var. caesius* and used in the treatment of several cancers. [18]

Doxorubicin acts by intercalating to DNA and stabilizing the topoisomerase II-DNA complex, preventing the resealing of DNA double helix, thus stopping the replication process. [19] The apoptosis pathway is triggered when the cell fails to repair the DNA and growing stops at G1 and G2 phase. [17] It also causes oxidative stress by generating free radicals that cause damage to the cellular membranes, DNA and proteins. [18]

Since doxorubicin does not have a specific target, these mechanisms will not only affect tumor cells but also normal cells of the body, leading to severe toxicity. Besides the common side effects of other chemotherapist agents – such as nausea, vomits and alopecia – it also causes brain, liver, kidney and cardiotoxicity, being this last the most problematic and concerning toxic effect of the drug. The generation of reactive oxygen species (ROS) by DOX leads to structural modifications of cardiomyocytes resulting in the activation of the apoptosis pathway. [17] Since cardiomyocytes have high reliance on oxidative substrate metabolism they are more sensitive to the oxidative stress caused by DOX than tumor cells, [19] thus there is a need to find a way to reduce the dose of DOX to attenuate the cardiotoxicity without decreasing the cytotoxic effects on tumor cells.

### **1.2.2 Cisplatin**

Cisplatin (CIS) is a platinum-based anticancer agent largely used in chemotherapy. It is an inert platinum complex that once inside the cell is activated by the substitution of its cis-chloro groups for water molecules (aquation) due to the low concentration of chloride ions in the cytoplasm. Aquated CIS binds to the nucleophilic part of the DNA and forms covalent adducts, creating damage in the DNA that when irreparable leads to cellular senescence and apoptosis. The aquated form of CIS also binds to the cystein-containing reducing species in the cytoplasm, promoting oxidative stress that also leads to DNA damage and cytotoxic effect. [20]

Cisplatin also has cytotoxic effects and causes direct damage to the renal tubule epithelium leading to a decrease glomerular function and electrolyte loss. It also has a risk of ototoxicity normally associated with cumulative doses in young-age. [21]

### **1.2.3 Methotrexate**

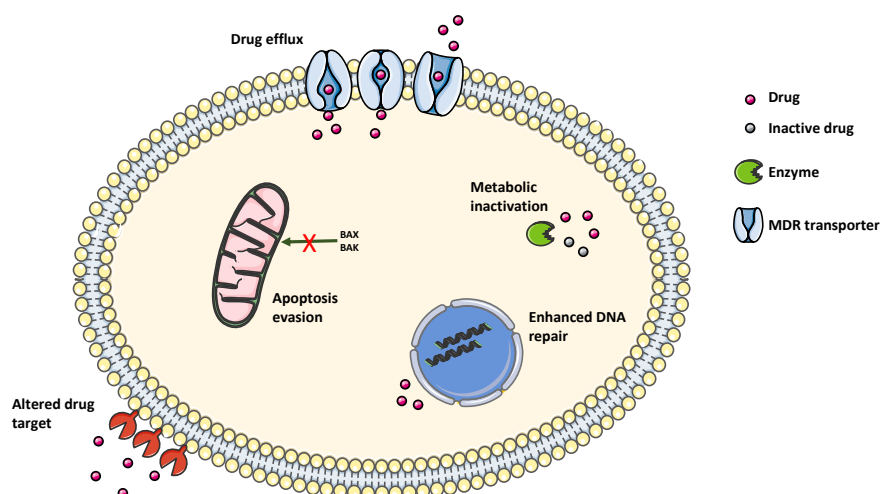
Methotrexate (MTX) is an antifolate used in the treatment of different types of cancer such as breast, head and neck, non-Hodgkin lymphoma, osteosarcoma and bladder cancer and used in treatment of some auto-immune disorders like rheumatoid arthritis, psoriasis, lupus and crohn's. Antifolates induce cell death by targeting and inhibiting key folate-dependent enzymes, leading to the inhibition of nucleotide biosynthesis. [22] MTX competitive inhibits the conversion of dihydrofolate (DHF) in tetrahydrofolate (THF) by binding to dihydrofolate reductase (DHFR) with higher affinity than DHF. Since THF is crucial for *de novo biosynthesis* of thymidine and purines, which are needed to DNA synthesis. By blocking THF synthesis, MTX leads to inability of cells to divide and produce proteins, resulting in cell death.

MTX is administrated in a wide range of doses depending on the indication, and higher doses are used in cancer treatment - high-dose methotrexate (HDMTX). Prolonged exposure to HDMTX leads to significant morbidity and mortality, being acute kidney injury the main toxic effect of the drug. [23] Methotrexate causes kidney injury due to precipitation of the molecule and metabolites in the distal renal tubules, [21] which impairs the renal clearance of HDMTX, leading to accumulation of toxic concentrations and increased risk of additional side effects, as myelosuppression, mucositis and hepatotoxicity. [23]

### **1.2.4 Resistance to therapy**

The use of chemotherapeutic agents increased the survival rate of OS but it has quickly reached a plateau, with the current 5-year survival rate remaining at 60-66%. [1] Chemotherapy is limited by the toxic side effect of the drug, but also due to the development of chemoresistance by the cancer cells, a concerning event that happens in neoplastic diseases and that is a major concern in osteosarcoma. [24] Chemoresistance may be present even before the beginning of therapy, and it's called primary resistance. After the eradication of the chemosensitive subpopulation of the tumor, residual tumor cell clones with intrinsic resistance are able to survive and restore the lesion. On the other hand, tumors are also able to acquire resistance, adapting to the treatment cycles. [25] Acquired resistance is influenced by genetic and environmental factors, that facilitate the development of resistant clones. This is supported by the genetic instability of the tumors and its heterogeneity, that under therapeutic pressure may result in several cellular changes that can affect metabolic pathways that are involved in the response to therapy, that may influence the response to other drugs, leading to multidrug resistance.

Chemoresistance can be modulated by different mechanisms (Figure 1.1) and include changes in the drug transport and metabolism, modification of the target and elevated threshold to initiate cell death. [25,26]



**Figure 1.1 – Molecular mechanisms involved in resistance to chemotherapeutics.** (Adapted from Patel *et al.*) [27]

Drug transport is mediated by the ATP-binding cassette (ABC) membrane transporters. These transporters, like ABCB1, MRP1 or ABCG2 are implicated in the multi-drug resistance (MDR) phenotype since they increase the drug efflux, causing a decrease in the intracellular drug accumulation, conferring resistance to a range of chemotherapy drugs. [25,28]

Cancer cells are able of metabolic inactivation of drugs by protein binding, conjugation and oxidation/reduction reactions. Some drugs need to undergo metabolic activation after entering the cell to be effective. Downregulation or mutations on the metabolic activation pathways prevent this activation, conferring resistance to the cells. [25]

The same happens with the cancer cell capacity to acquire mutations that lead drug target alteration or the capacity of to enhance the DNA damage repair by primary repair mechanisms like nucleotide excision repair or homologous recombination. [24,28]

The fate of the cancer cells is determined by the threshold to undergo committed cell death, that is the ultimate effect of the anticancer drugs. The conditions to which cancer cells are exposed (like oncogenic stress, genetic instability and hypoxia) are situations that under normal conditions would lead to an internal apoptotic stimuli. However, cancer cells have the capacity to avoid apoptosis by disabling the apoptotic pathways machinery through several mechanisms. This capacity not only gives them a survival advantage but also is an important mechanism of chemoresistance. Regulation of the apoptotic pathways can occur



transcriptionally, translationally or post-translationally. Transcriptionally and translationally regulation can alter the threshold to induce apoptosis at gene expression level by gene amplification, gene deletion, gene silencing or regulation of transcription factors, which leads to increasing or blocking the expression of BCL-2 family protein members, which control cell death. An example is the inactivation of the TP53 gene in cancer cells, limiting the expression of the pro-apoptotic proteins BAX, PUMA, NOXA. Post-translational regulation is implicated in the protein stability and function. The pathways of stabilization or degradation of the BCL-2 proteins are deregulated in cancer cells, leading to an increased degradation of pro-apoptotic proteins or a stabilization of the anti-apoptotic members, through the regulation of ubiquitination and phosphorylation reactions. [29]

One of the outcomes of the selective pressure exerted by chemotherapeutic is the concept of phenotypic switching, that suggest that cells are able to adapt to a specific microenvironment by changing its phenotype. Studies show that the use of anticancer drugs can induce a stem-like phenotype in previous differentiated cells, resulting in a process called dedifferentiation. This concept of cell plasticity lead to the emerging of a new subpopulation of cells that were initially negative to specific cancer stem cells (CSC) biomarkers or had their controlling pathways inactive. Therefore, this new subpopulation has enhanced tumorigenic ability and drug resistance and capacity for metastatic dissemination. An example of this mechanism is the induction of CSC in osteosarcoma cell lines through the activation of Notch pathway by DOX. Furthermore, pre-existing CSC are selected and spared from the treatment due to their intrinsic resistance mechanisms. [30] These mechanisms include increased expression of drug efflux transporters; the ability to reversibly enter a G0-like cell cycle phase – quiescence; elevated expression of antiapoptotic proteins – increasing the apoptotic threshold – and the enhanced DNA repairing skills, that may also be related with the quiescence state. [30,31]

Since CSC are responsible for tumor growth and metastasis, both this mechanisms of drug-induced stemness and CSC selection comprise an important, and possible the most relevant, drug resistance mechanism, with a remaining cell population after treatment that is not only resistance to therapy but also capable to repopulate the tumor.

### ***1.3 The BCL-2 protein family***

Apoptosis is a way of programmed cell death that organisms developed to eliminate unhealthy cells following cellular stress. Its activated in response to several cellular stimuli that initiate the apoptotic pathway. It can be initiated by different stimuli that lead to two pathways: the intrinsic pathway, in response to intracellular stress like DNA damage or metabolic stress;

the extrinsic pathway, follow binding of death ligands to their cognate death receptors on the plasma membrane. [29,32]

Intrinsic pathway is initiated by mitochondria outer membrane permeabilization (MOMP) that is regulated by the balance between anti and pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family. Bcl-2 family is divided into three subfamilies: a) Pro-apoptotic effector proteins BAK and BAX that mediate MOMP; b) Pro-apoptotic BH3-only proteins BID, BIM, BAD, NOXA and PUMA that directly and indirectly promote apoptosis; c) Anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 and A1 that antagonize MOMP. When the balance between these members is in favor of apoptosis, BAK and BAX form oligomers that permeabilize the MOM, releasing cytochrome C into the cytoplasm where it facilitates caspase-9 activation and initiates the caspase cascade. [33]

BCL-2 family protein members share homology in one or more Bcl-2 homology domains, called BH-domains (BH1-BH4) that are essential for their function, since the proteins interact through the BH domains to promote or antagonize apoptosis. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit apoptosis by preventing BAK/BAX oligomerization, either by binding and sequestering BAX/BAK or the BH3-only activators. [34]

BH3-only pro-apoptotic proteins can regulate the induction of MOMP directly or indirectly by interacting with other Bcl-2 family members, and two different theories are proposed to explain this mechanism. Direct activator-depressor model mentions that BH-3 only proteins can be divided in direct activators and depressors/sensitizers. Direct activators such as BIM, PUMA and BID release BAX/BAK from the anti-apoptotic members for activation and also bind to them directly inducing allosteric changes that lead to their homo-oligomerization, while depressors/sensitizers like BAD bind competitively to Bcl-2 antiapoptotic proteins, releasing the direct activators so they can bind to BAK to induce its oligomerization. Alternatively, according to the indirect activator model, the anti-apoptotic members bind constitutively and suppress BAX/BAK function, so the BH3-only members neutralize the anti-apoptotic members, making them release BAX/BAK to be ready for activation. [29,33]

### **1.3.1 BH3 mimetics**

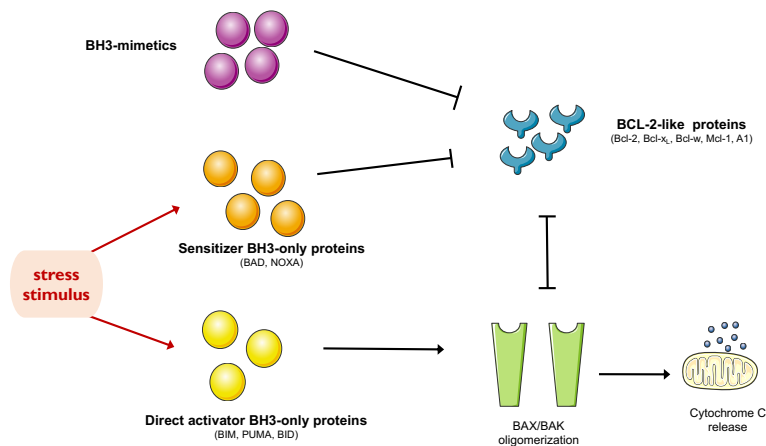
The Bcl-2 protein family plays an important role in the apoptosis regulation and its altered expression is critical for cancer development and constitutes a critical obstacle to therapeutic efficacy. Therefore, targeting these proteins would be a promising approach in cancer treatment.

Studies using murine models of leukemia and Myc-driven lymphoma showed that inhibition of anti-apoptotic proteins lead to apoptotic induction and cancer remission. [35]

Through the understanding of Bcl-2 proteins interactions, functions and structures it was possible to develop a new class of chemotherapeutics so-called “BH3 mimetics” (Figure 1.2). These new drugs are small-molecule compounds that bind specifically to the hydrophobic groove of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins and block their function, allowing the activation of the intrinsic apoptotic pathway. [36]

Studies had been performed in order to find small-molecules able to inhibit these anti-apoptotic proteins by screening libraries of natural and computer-designs products. [36] The first findings lead to the discovery of molecules like HA14-1, Antimycin A and Obatoclax, that showed activity in inhibiting the BCL-2 pro-survival members, but were latter proved to have low affinity to the BH3 binding groove or shown to have a BAX/BAK independent killing. [33,35]

Later, Abbot laboratories developed ABT-737, a small-molecule that sowed to have similar effect as BAD-derived peptides, and binds to Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-w with high affinity. [37]



**Figure 1.2 – Interactions between Bcl-2 family members and BH3-mimetic to initiate apoptosis.** (Adapted from Delbrige *et al.*) [38]

### 1.3.2 ABT-737

As mentioned before, ABT-737 was developed in 2005 by Abbot laboratories. Although other molecules were already under studies, it has not been yet possible to obtain a potent small-molecule capable of targeting a protein-protein interaction. So, Oltersdorf *et al.* were able to develop a new molecule by NMR-based screening, parallel synthesis and structure-based design. They demonstrated that ABT-737 binds with high affinity ( $K_i \leq 1$ nM) to the hydrophobic groove of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 and Bcl-w. By

binding to the anti-apoptotic proteins, ABT-737 mimics the effect of BAD, indirectly activating BAK/BAX by releasing them from the pro-survival members, as well as the direct activators BH3 only proteins. [37] The action mechanism of ABT-737 was later confirmed by *in vitro* studies in chronic lymphocytic leukemia cells, in which was demonstrated its high affinity to bind Bcl-2 protein in and also its capacity to displace BIM from the Bcl-2. [39] Other study also proved its binding affinity to Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-w, but not Mcl-1 and A1, further demonstrating that high levels of MCL-1 could lead to ABT-737 resistance. [40] *In vivo* studies using mouse models also confirmed the capacity of ABT-737 to induce apoptosis in acute myeloid leukemia. [41]

ABT-737 has been reported to have a benefic effect in various types of cancer. Noll *et al* reported that ABT-737 was capable of induce cellular death in prostate cancer cells in sub-toxic concentrations, proving to have a synergistic or additive effect with a specific immunotoxin. [42] Other studies showed that ABT-737 decreases cell viability in ovarian, breast and pancreatic cancer when in combination with other anti-cancer drugs, once again proving its synergic or additive effect. [43–45]

## **1.4 Objectives**

Based on the aforementioned, the main objective of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of the BH3 mimetic drug – ABT-737, alone and in combination with doxorubicin in two established osteosarcoma cell lines, with the ultimate goal to investigate whether this drug could be used as a chemosensitizer of doxorubicin in doxorubicin-resistant osteosarcoma.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Cell culture**

Osteosarcoma cell lines MNNG/HOS and MG-63 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and culture in monolayer with RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich®, USA) supplemented with 10% v/v heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco® Invitrogen Life Technologies) and 1% v/v antibiotic/antimycotic containing 100 mg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin and 0.25 µg/ml amphotericin (Sigma-Aldrich®, USA) and maintained under standard adherent conditions in T75 and T25 flaks at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Cells were subcultivated twice a week when reached approximately 8% of confluence. All the procedures were made in sterile conditions in a laminar flow chamber.

#### **2.1.1 Cell counting and viability**

Cell counting and viability were determined before every experiment, through the trypan blue exclusion method. The method is performed by counting on the microscope the clear bright cells, based on the principal that viable cells with intact cellular membrane exclude the dye, appearing clear when observed, while dead or injured cells with damage membrane dye blue. For the procedure, equal volumes (10µl) of cell suspension and trypan blue 0.4% were mixed, transferred into a Neubauer chamber and observed and counted in an inverted microscope. Only cells with viability higher than 90% were used.

### **2.2 Cytotoxicity assays**

Both cell lines were assayed for sensitivity to their sensitivity to DOX and ABT-737. The cytotoxicity was evaluated by measuring the drug effects on cell viability using the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and the effects on apoptosis were analyzed by flow cytometric Annexin V assay.

Expanded cells with 70% confluence were detached using trypsin (Sigma-Aldrich®, USA), counted and seeded at appropriate plating density. Plates were maintained at 37°C overnight to allow cells to attach. Next day, different concentrations of drugs both alone and in combination were added to adherent cells and incubated during certain periods of time, which will be indicated in each experiment.

Aliquots with different dilutions of DOX (DOXO-cell®, 2mg/mL) stock solution were prepared with PBS. ABT-737 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germany) was

reconstituted with sterile dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in different concentrations with the same solvent.

### 2.2.1 MTT reduction assay

The MTT reduction assay is a colorimetric assay based on the cleavage of the yellow-colored salt MTT in a blue-colored insoluble formazan crystal by the mitochondrial enzyme succinate-dehydrogenase. This reaction only occurs if the cells are viable and with functional mitochondria, therefore the quantity of formazan crystals formed during the exposition is directly proportional to the number on viable cells. After dissolution of the formazan crystals, the color intensity is measured by spectrophotometry, being the color intensity directly proportional to the quantity of crystals and number of viable cells. [46]

Cells dissociated and counted as previously described were seeded in 96-wells plates at a density of 4000 cells/well. Cells were allowed to attach overnight and were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Next day cells were incubated for 48h with both drugs alone and in combination at a fixed ratio of 1:5 in different concentrations as showed in Table 2.1. A control with the solvent of ABT-737, DMSO was performed to evaluate its possible effect on viability.

**Table 2.1 – Drug concentrations used in the MTT reduction assay.**

<b>[DOX] μM</b>	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
<b>[ABT] μM</b>	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0

After the 48h incubation the medium was removed and 50μl of MTT reagent (Sigma-Aldrich®, USA) was added to each well and incubated for 4h in the dark at 37°C to allow the formation of the formazan crystals. Afterward the formazan crystals were dissolved with 100μl of acidified isopropanol (0.04M HCl). The absorbance was read at 570nm with a reference wavelength of 600nm in an automatic ELISA microplate reader (Synergy HT, Biotek Instruments) using the Gen5 software.

The percentage of viable cells relatively to the controls was calculated using the following formula. Untreated or DMSO-treated cells were used as controls for DOX-treated cells and ABT-737 and combination treated cells, respectively.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Absorbance (sample)}}{\text{Absorbance (control)}} \times 100$$

### 2.2.2 Apoptosis analysis by flow cytometry

Apoptosis analysis was performed based on the Annexin V/7-Aminoactinomycin D (7-AAD) staining method. Annexin V is a protein that binds with high affinity to the phospholipid phosphatidylserine (PS). When the cell enters apoptotic death there are a perturbation on the membrane phospholipids and PS, usually exposed on the cytosolic side of the membrane, becomes exposed at the outer membrane. Therefore, annexin V (that does not penetrate the cell membrane) binds to PS, indicating the early apoptotic stage. [47] 7-AAD is a fluorescent derivate of actinomycin D that binds selectively to the DNA when the cell membrane is compromised, detecting late-apoptotic and necrotic cells. [47,48]

Cells dissociated and counted as previously described, were seeded in 12-wells plates at a density of 15.000cells/well for the control (untreated cells) condition and at 40.000cells/well for drugs treatment. Cells were allowed to attach overnight and were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Next day cells were incubated 48h with the drugs both alone and in combination in different concentrations as seen in Table 2.2. After incubation period, cells were washed with PBS and detached with 300µl of trypsin and collected together with the medium to collection tubes. Cells were centrifuged at 1800rpm and 20°C for 5min, resuspended with 1ml of Annexin binding buffer (Immunostep, Spain), centrifuged again at 500g for 5min and finally resuspended with 100µl od Annexin binding buffer (Immunostep, Spain). Afterwards, cells were incubated with 3µl of FITC-Annexin V (Immunostep, Spain) and 5µl of 7AAD (Molecular Probes, USA) antibodies for 15min in the dark. Stained cells were subjected to flow cytometry analysis using BD Accuri C6 (BD Biosciences).

**Table 2.2 – Drug concentrations used on the flow cytometry-based apoptosis assay.**

	Drugs combination	
	DOX (µM)	+ ABT (µM)
<b>MG-63</b>	1.0	1.0
	1.0	1.0
<b>MNNG/HOS</b>	1.0	2.0
	2.0	2.0

## **2.3 Synergy evaluation**

Synergistic effects of DOX with ABT were tested based on the combination ratio used in cell viability assays. Viability values were normalized to control cells and combination index (CI) was estimated to evaluate the presence of synergistic effects. CI was calculated using Chou-Talalay method [49] and the CompuSyn software (version 1.0 CompuSyn, Inc., Paramus, NJ). A combination index  $<0.9$  indicates synergistic,  $0.9-1.1$  additive and  $>1.1$  antagonistic interactions between ABT-737 and doxorubicin or cisplatin.

## **2.4 Gene expression analysis**

Gene expression analysis was performed using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). PCR is a technique of DNA amplification from a DNA template, using specific-sequence oligonucleotides and a heat-stable DNA polymerase. RT-PCR couples the conversion of RNA to cDNA by the reverse transcriptase, and the resulting cDNA is used as template for the reaction. Measuring the amplified product in real time is possible using fluorescent probes or DNA-binding dyes. [50,51]

For this assay, previously detached and counted cells were seeded at a density of 100 000 cells/well in 6-well plates and allowed to attach overnight. Next day, cells were incubated for 48h with both drugs alone and in combination at the concentration of  $1\mu\text{M}$  for the MG-63 cell line and  $2\mu\text{M}$  for the MNNH/HOS.

### **2.4.1 RNA extraction**

The RNA extraction was performed using the ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, USA) accordingly to the manufacture's indications.

After drugs incubation period, cells were washed with 2ml of PBS solution and  $200\mu\text{l}$  of a combined solution of guanidine thiocyanate with  $1\text{-thioglycerol}$  was added to the cells to disrupt nucleoprotein complexes, allowing the releasing of the RNA. Then,  $68\mu\text{l}$  of isopropanol was added to cell lysates, transferred to the microcolumn and centrifuged at  $14000g$  and  $20^\circ\text{C}$  for 30sec. This process allowed the precipitation of the nucleic acids that bound to the bottom of the microcolumn. To digest the contaminating genomic DNA,  $30\mu\text{l}$  of a DNase mix was added to the bottom of the column and incubated for 15min. Finally, the RNA bounded to the microcolumn was eluted with  $15\mu\text{l}$  of nuclease-free water and centrifuged for 1min at  $14000g$ . Middle washing steps using a RNA wash solution and centrifugation were performed to purify the RNA from contaminating salts, proteins and cellular components. The concentration of the isolated RNA was measured at  $260\text{nm}$  using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Purity was assessed using the ratio of absorbance at  $260\text{nm}$  and



280nm. Only samples with a 260/280 ratio higher than 2.0 were used in the subsequent applications.

### **2.4.2 cDNA synthesis**

First-strand complementary DNA was synthesized using the NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech, Portugal), accordingly to the manufacture's indications. To 1 $\mu$ g of purified RNA was added 10 $\mu$ l of NZYRT 2x Master Mix containing primers, dNTPS, MgCl<sub>2</sub> (a co-factor of reverse transcriptase) and a RT buffer; and 2 $\mu$ l of NZYRT Enzyme Mix containing the reverse transcriptase (that binds the dNTPs to the single strand RNA) and a ribonuclease inhibitor to protect the RNA degradation. The mix is then incubated at 25°C for 10min, 50°C for 30min and heated at 85°C for 5 min and chilled on ice to inactivate the reaction.

After incubation, the final addition of 1 $\mu$ l of RNase H (E. coli) and a new incubation at 37°C for 20min provided the degradation of the RNA strand, leaving the cDNA ready for the qPCR.

H<sub>2</sub>O mQ was used as solute and the final solution was diluted to achieve the concentration of cDNA of 10ng/ $\mu$ l. The samples were maintained at -80°C until use.

### **2.4.3 qRT-PCR**

Quantitative real time PCR was performed using KAPA SYBR® FAST qPCR kit (KAPA BYOSYSTEMS, USA) in a Bio-rad Mycycler iQ5 system (Bio-Rad). HPRT-1, GAPDH and 18S were used as housekeeping genes for normalization. The sequences of both the target and housekeeping genes are described in Table 2.3 and were purchased from NZYTech. Sequences were previously validated/published, as indicated in Table 2.3.

To perform this the experiment, 2.5 $\mu$ l of cDNA were mixed with 5 $\mu$ l of SYBR Green master mix, 2 $\mu$ l of primers (forward and reverse) and 0.5 $\mu$ l of RNase free water. Each sample was tested in duplicate. Once plated, samples were denatured at 95°C for 3min, followed by 40 cycles of 3sec at 95°C for denaturation, 20sec at 55°C for annealing and 20sec at 72°C for extension. On each real time PCR plate there was a non-template control present for each pair of analyzed primers.

Target gene expression levels were normalized to the housekeeping genes using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

**Table 2.3 – Primer sequences used to perform RT-qPCR analysis.**

<b>Gene</b>	<b>Forward (5'-3')</b>	<b>Reverse (5'-3')</b>
<b>KFL4</b> [52]	CCACACTTGTGATTACGCGG	TACGGTAGTGCCTGGTCAGT
<b>OCT4</b> [52]	TCTGCATCCCTTGGATGTGC	GTGTGGCCCCAAGGAATAGT
<b>SOX2</b> [52]	CATGCACCGCTACGACG	CGGACTTGACCACCGAAC
<b>I8S</b> [53]	GAAGATATGCTCATGTGGTGTG	CTTGTACTGGCGTGGATTCTG
<b>GADPH</b> [53]	ACAGTCAGCCGCATCTTC	GCCCAATACGACCAAATCC
<b>HPRT-I</b> [53]	TGACACTGGCAAACAATG	GGCTTATATCCAACACTTCG

## **2.5 Statistical analysis**

Graphic illustrations and statistical analysis were computed using GraphPad Prism version 7.0a (GraphPad Software, San Diego, CA).  $p < 0.05$  was considered the statistical significance level.

### 3. Results

#### 3.1 Sensitivity of MG-63 and MNNG/HOS osteosarcoma cells to doxorubicin

We start by evaluating the chemosensitivity profile of two osteosarcoma cell lines MG63 and MNNG/HOS to DOX, which is the main chemotherapeutic drug used in the treatment of osteosarcoma. With this purpose, cells were incubated with different drug concentrations during 48h, and then assayed with the MTT assay. As depicted in Figure 3.1, a concentration-dependent cytotoxicity effect of doxorubicin was observed in both cell lines. However, the MNNG/HOS cell line appears to be less susceptible to this drug since for the same DOX concentration, the percentage of viable cells is slightly superior to that in the MG-63 cell line

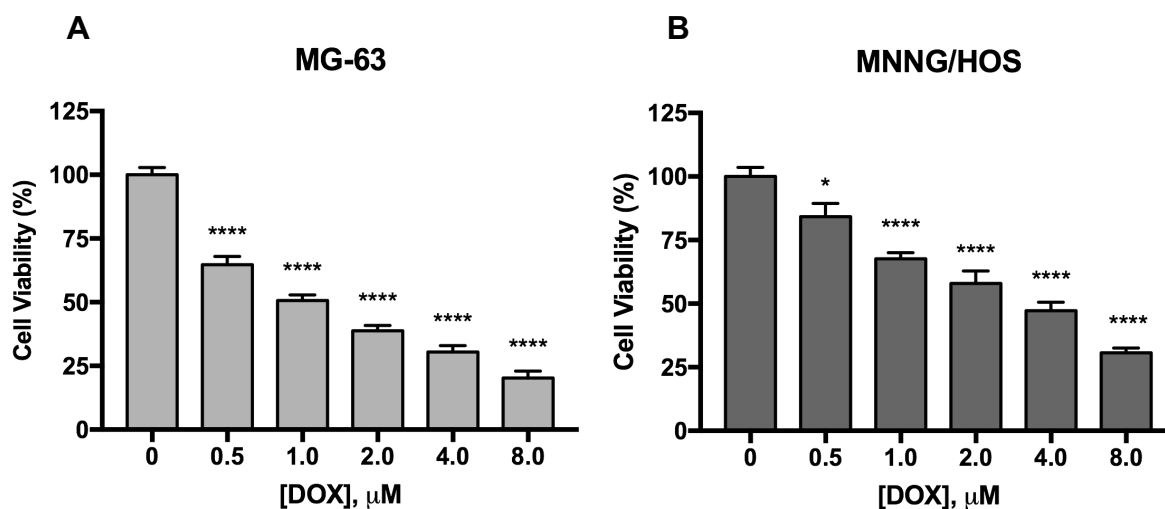


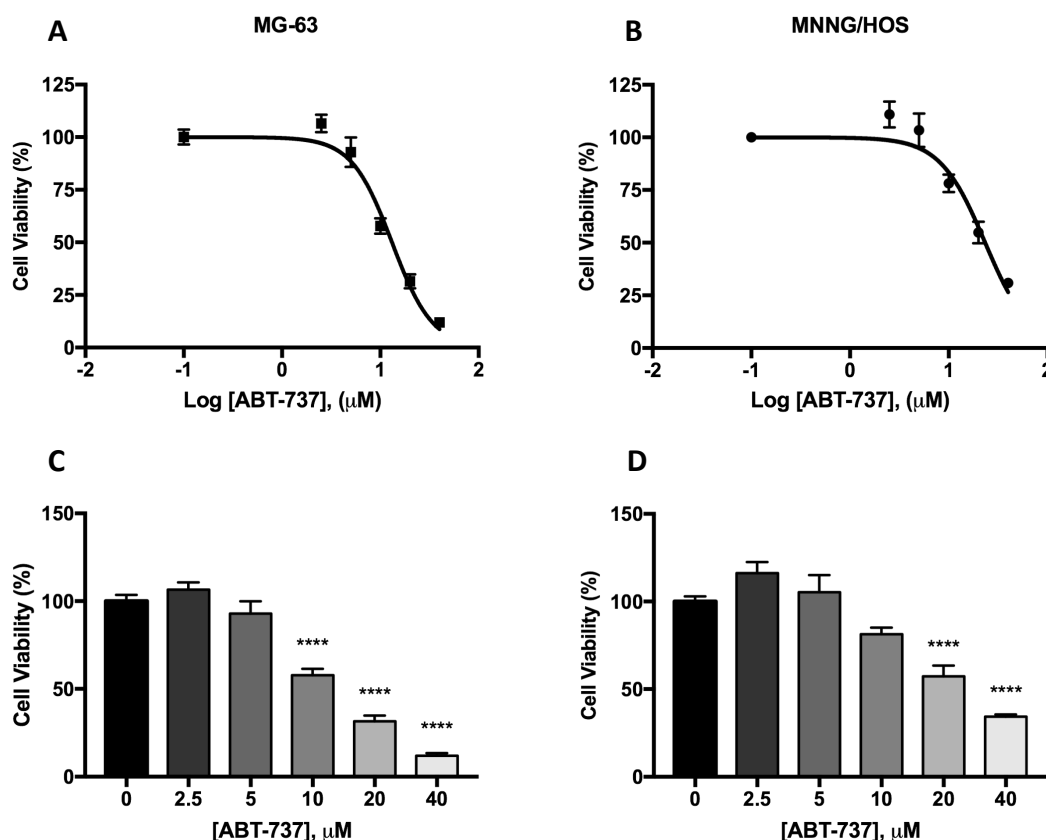
Figure 3.1 – Effects of DOX on viability of (A) MG-63 and (B) MNNG/HOS cell lines after 48h incubation. Cell viability was measured using the MTT assay and data normalized to absorbance of untreated cells. Data represents mean values  $\pm$  SEM of 4 independent experiments (n=4) performed in duplicate. \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001 compared with untreated cells (One-way ANOVA with Dunnet's correction).

#### 3.2 Sensitivity of MG-63 and MNNG/HOS cells to ABT-737

Since the main goal of this of the project was to explore the chemosensitizer effects of the BH3 mimetic ABT-737 on DOX through direct inhibition of Bcl-2 and Bcl-xl anti-apoptotic proteins first we evaluated the susceptibility of MG-63 and MNNG/HOS cell lines to ABT-737 per se. For that, cells were incubated with different concentrations of ABT-737 ranging from 2.5 to 40  $\mu\text{M}$ , during 48h. Cell viability was determined using the MTT assay and

the obtained drug concentration-response curves were adjusted to a sigmoidal fitting to determine the  $IC_{50}$ .

The results presented in Figure 3.2 showed that both cell lines are susceptible to ABT-737 as indicated by the progressive decrease in cell viability in both cell lines in a concentration-dependent manner, with an estimated mean  $IC_{50}$  value of  $13.14\mu M$  for the MG-63 cell line and  $25.21\mu M$  to the MNNG/HOS cells.



**Figure 3.2 – Effects of ABT-737 on viability of MG-63 and MNNG/HOS cells after 48h incubation. Cell viability was measured using the MTT assay and data normalized to absorbance of untreated cells. Representative concentration-response curves for (A) MG-63 and (B) MNNG/HOS cell lines fitted to a sigmoidal function. Bar graphs representing the effects of increasing concentrations of ABT-737 on cell viability of (C) MG-63 and (D) MNNG/HOS cell line. Data represents mean values  $\pm$  SEM of 4 independent assays (n=4) performed in duplicate. \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with untreated cells (One-way ANOVA with Dunnet's correction).**

The bar graphs depicting the cell viability data confirmed the ABT-737-induced cytotoxicity (as a single-agent) against both OS cell lines. Curiously, although both cell lines are sensitive to ABT-737, the effect in cell viability is less pronounced in the MNNG/HOS cell line when compared to the MG-63, as showed in Figure 3.2 as previously observed for DOX. Accordingly, the statistical analysis revealed significant decreases in cell viability for concentrations  $\geq 10\mu M$  for the MG-63 cell line and only  $\geq 20\mu M$  for the MNNG/HOS cells, which is consistent with the  $IC_{50}$  values.

This observation suggest that the MNNH/HOS cells is less sensitive to ABT-737 than the MG-63 cell line, and probably requires a higher drug concentration to achieve the same cytotoxic effect.

### 3.3 ABT-737 and doxorubicin synergistically decreased viability of osteosarcoma cells

After demonstrating the cytotoxicity of ABT-737, as single-agent in OS cells lines, we then evaluated whether this drug could potentiate and enhance the cytotoxic effects of doxorubicin towards MG-63 and MNNG/HOS osteosarcoma cells.

To identify any possible synergistic or additive effect between doxorubicin and ABT-737 we used different drug combinations at a fixed ratio of 1:5. The effects of the drugs alone and in combination on cell viability are presented in Figure 3.3. Cell viability analysis showed that co-treatment with ABT-737 increased the susceptibility of MG-63 cell line to doxorubicin. Less pronounced effects were observed in the MNNG/HOS cell line, further confirming the high resistance profile of this cell line either to DOX or ABT-737.

Combination index (CI) calculated using the Chou-Talalay method show synergistic effects between doxorubicin and ABT-737 at all dose combinations tested.

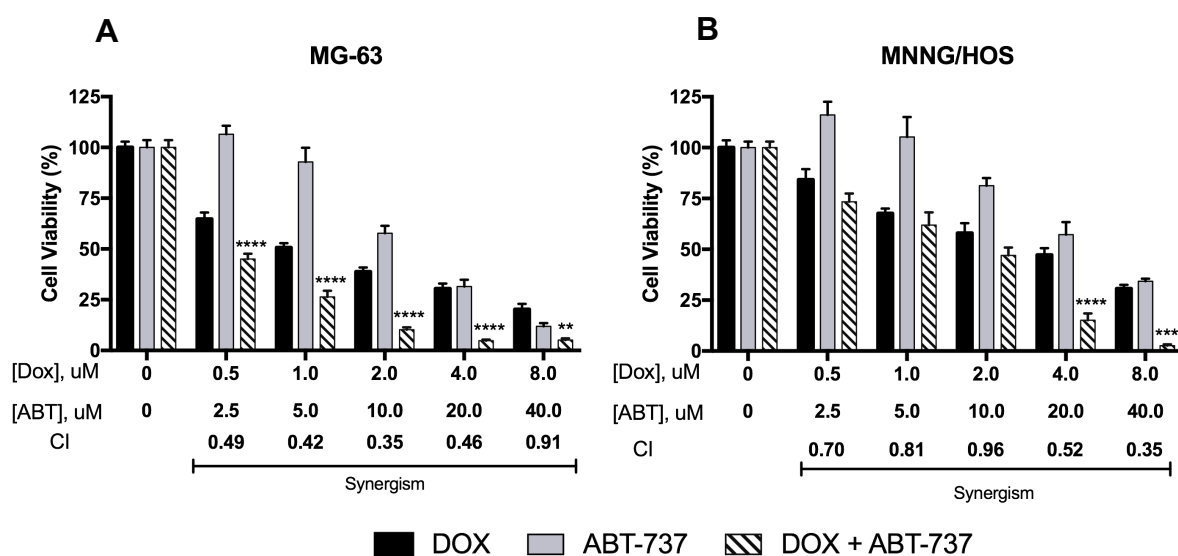


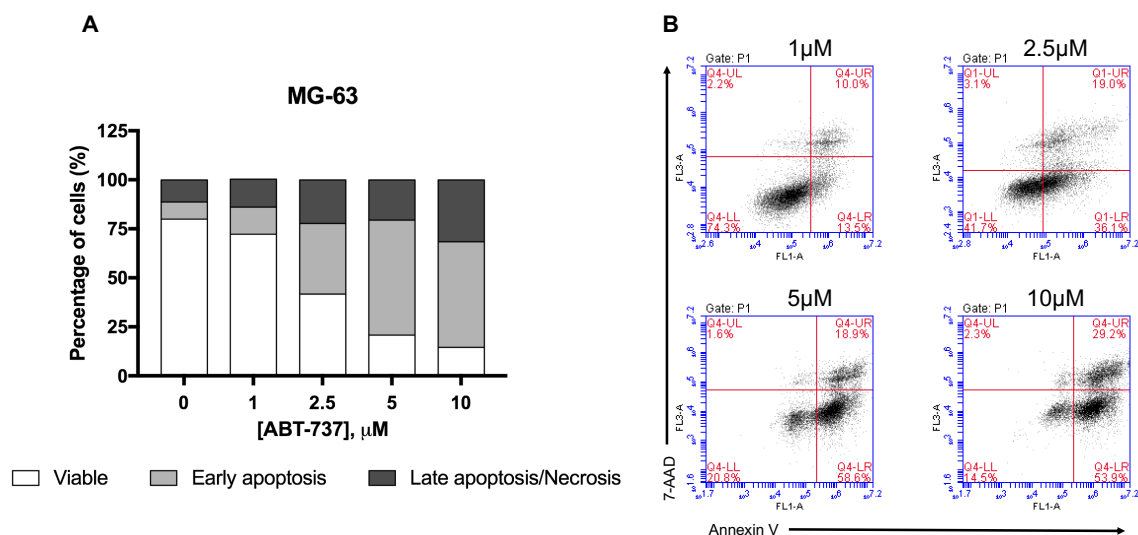
Figure 3.3 – Percentage of viable cells for (A) MG-63 and (B) MNNG/HOS cell lines after 48h treatment with DOX and ABT-737 alone and in combination at a fixed ratio of 1:5. Chou-Talalay method was used to estimate additive or synergistic effect between the drugs, in affecting cell viability. Data represents mean values  $\pm$  SEM of 4 independent assays (n=4) performed in duplicate. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001 compared to doxorubicin treated cells (Two-way ANOVA with Dunnet's correction).

### 3.4 Treatment with ABT-737 sensitizes osteosarcoma cells to apoptotic cell death

To explore if ABT-737 is able to induce apoptosis in OS cells, we performed a flow cytometry study using Annexin V/7AAD double staining.

For that, MG-63 cells were treated with increasing concentrations of ABT-737 ranging from 1 to 10 $\mu$ M during 48h. The results presented in Figure 3.4 show a progressive decrease in the percentage of viable cells with a concomitant increase in the percentage of early [annexin V (+) / 7AAD (-)] and late apoptotic cells [annexin V (+) / 7AAD (+)] with increasing drug concentrations. This effect was more pronounced for concentrations equal or above to 2.5 $\mu$ M.

In detail, cell viability of MG-63 cells treated with 2.5 $\mu$ M of ABT-737 was of 41.7% which progressively decreased to 20.8% and 14.5% for in cells treated 5 $\mu$ M and 10 $\mu$ M of ABT-737 respectively, an effect that was followed by an increase in the percentage of cells in early (2.5 $\mu$ M – 36.1%, 5 $\mu$ M – 58.6%, 10 $\mu$ M – 53.9%) and late apoptotic/necrotic cells (2.5 $\mu$ M – 19.0%, 5 $\mu$ M – 18.9%, 10 $\mu$ M – 29.2%).

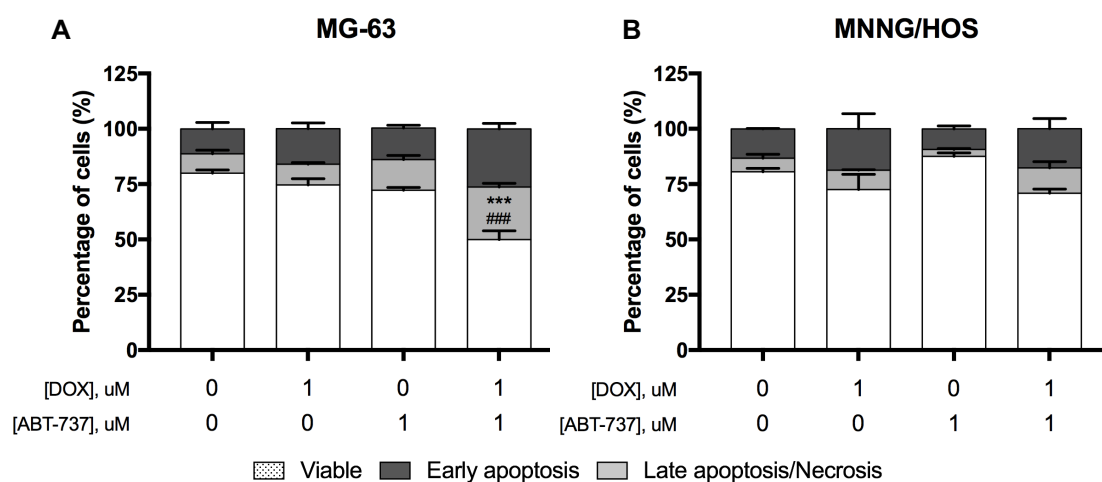


**Figure 3.4 – Effects of ABT-737 on apoptosis induction in MG-63 cells after 48h incubation. Apoptosis was determined by flow cytometry using the Annexin V/7AAD staining method. (A) Bar graph represents percentage of viable and apoptotic/necrotic cells for each ABT-737 concentration tested. (B) Representative images of flow cytometry analysis of apoptosis by annexin V/7AAD double staining. The lower left quadrant (annexin V<sup>-</sup>/7AAD<sup>-</sup>) was considered as viable cells, the lower right quadrant (annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>) was considered as early apoptotic cells, the upper right quadrant (annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup>) was considered as late-apoptotic cells and the upper left quadrant (annexin V<sup>-</sup>/7AAD<sup>+</sup>) was considered as necrotic cells. Data represents absolute values of one assay (n=1).**

Based on the results presented on Figure 3.4, we decided to proceed with the drug combination studies, to see if there is any sensitizing effect of ABT-737 on doxorubicin-induced apoptosis.

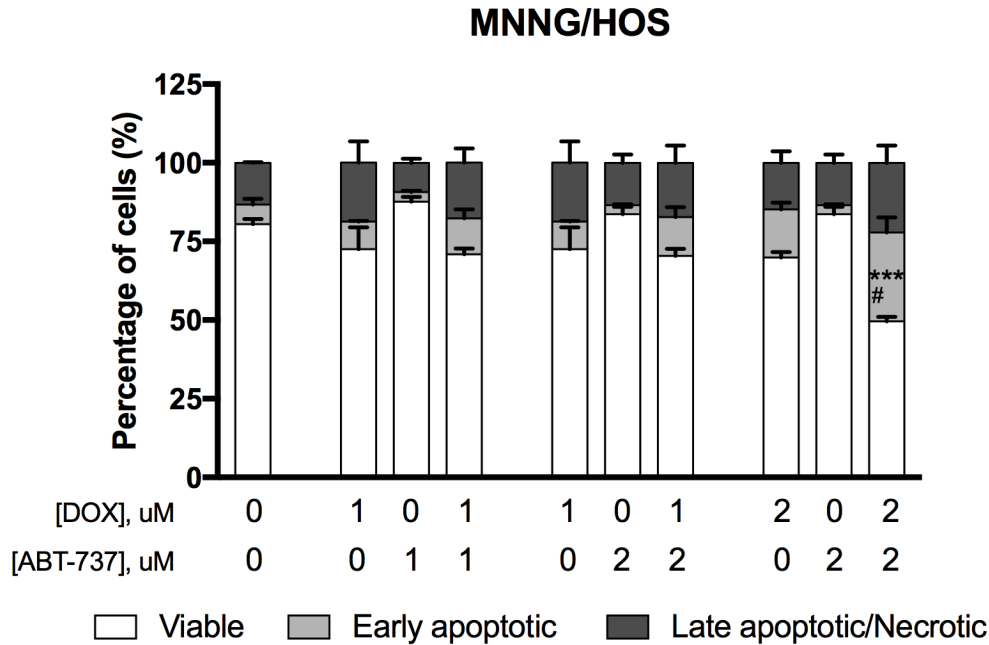
For that, cells were incubated with cytostatic concentration of each drug that per se does not cause significant apoptosis. Both cells lines were treated with 1  $\mu$ M of both DOX and ABT-737 alone and in combination for 48h. As depicted in Figure 3.5, only drugs administered in combination induced apoptosis in the MG-63 cells, as indicated by the significant increase in early and late apoptotic cells, as compared with untreated or DOX-treated cells. Neither DOX or ABT-737 at 1  $\mu$ M induced significant apoptotic effects.

Treatment of MNNG/HOS cells with the same drug schedule had no significant effect on cells viability and apoptosis.



**Figure 3.5 - Effects of DOX and ABT-737 alone and combined on apoptosis induction of (A) MG-63 cells and (B) MNNG/HOS cells after 48h incubation. Apoptosis was determined by flow cytometry using the Annexin V/7AAD staining method. Bars represent percentage of viable and apoptotic/necrotic cells for each treatment condition tested. Data represents mean values  $\pm$  SEM of 3 independent assays (n=3) performed in duplicate. \*\*\*p<0.001 compared to untreated cells, ####p<0.001 compared with DOX treated cells. (One-way ANOVA with Tukey's correction)**

Based on the later observation that co-treatment with 1  $\mu$ M of both drugs does not induce apoptosis in the MNNG/HOS cell line, we tested increasing concentrations of both drugs. Results from Figure 3.6 show that only the combination of 2  $\mu$ M of DOX with 2  $\mu$ M of ABT-737 was able to induce apoptosis, similar to that observed in the MG-63 cell line co-treated with 1  $\mu$ M of both drugs. This observation suggests that the MNNH/HOS cells are less sensitive to then MG-63 cells to the cytotoxic action of ABT-737, as it requires the double of drugs concentration to achieve the same apoptotic induction effect. In both cases it was demonstrated the ability of ABT-737 in sensitizing OS cells to DOX-induced apoptosis.



**Figure 3.6 - Effects of DOX and ABT-737 alone and in combination on apoptosis induction in (A) MG-63 cells and (B) MNNG/HOS cells after 48h incubation. Apoptosis was determined by flow cytometry using the Annexin V/7AAD staining method. Bars represent percentage of viable and apoptotic/necrotic cells for each treatment condition tested. Data represents mean values  $\pm$  SEM of 3 independent assays (n=3) performed in duplicate. \*\*\*p<0.001 compared to untreated cells, #p<0.05 compared with DOX treated cells. (One-way ANOVA with Tukey's correction)**

### **3.5 ABT-737 treatment modulates expression of pluripotency related transcripts**

The ABT-737 compound targets members of the Bcl-2 family of proteins, [37] but we cannot exclude that it may also modulate the expression of key stemness markers in osteosarcoma cells.

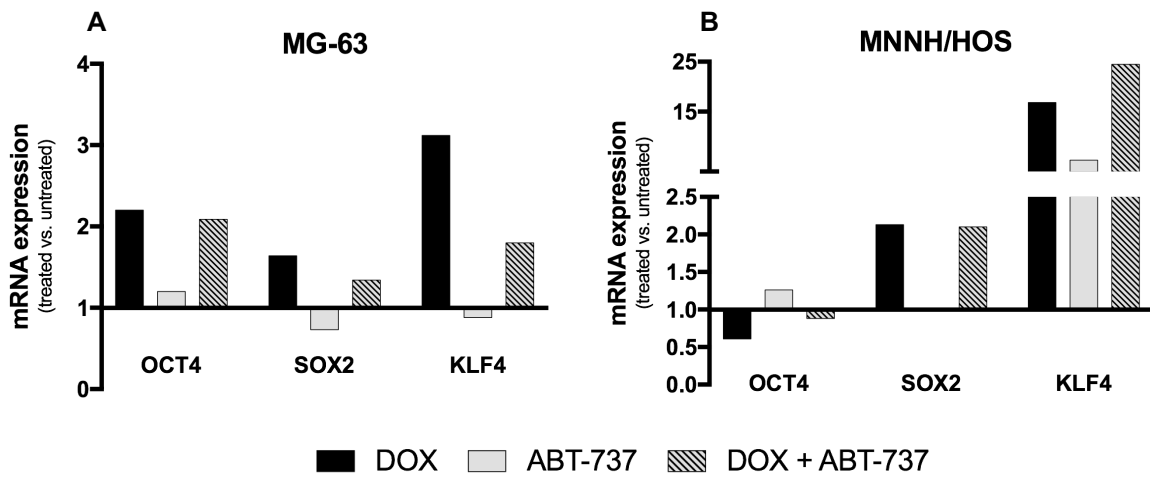
Both cell lines were treated with DOX and ABT-737 both alone and in combination, at the indicated concentrations, for 48h and then qRT-PCR was performed to analyze the gene expression of pluripotency related transcripts.

As presented in Figure 3.7, treatment with doxorubicin up-regulates the expression all OCT4, SOX2 and KLF4 genes in MG-63 cell line, an effect that was not completely prevented by ABT-737. Moreover, ABT-737 *per se* does not seem to have a significant impact on modulating the expression of pluripotency-related genes.

Regarding the MNNG/HOS cell line, treatment with DOX increased the expression of SOX2 and KLF4 but not OCT4, and also in this cell line ABT-737 had no preventive effect on



the upregulation of those genes. Treatment with ABT-737 upregulates the expression of KLF4, but not of OCT4 and SOX2 in this cell line.



**Figure 3.7 - Relative expression of OCT4, SOX2 and KLF4 in MG-63 and MNNH/HOS cell lines. Data represents relative changes in mRNA expression levels from treated cells relative to control (untreated cells) after normalization of Ct values to housekeeping genes. (A) MG-63 cells were treated with 1 $\mu$ M of doxorubicin and ABT-737 both alone and in combination during 48h. (B) MNNH/HOS cells were treated with 2 $\mu$ M of doxorubicin and ABT-737 both alone and in combination during 48h. Data represents absolute values of 1 independent assay (n=1) performed in duplicate.**

## 4. Discussion

In this study we purpose to evaluate the potential role of the BH3-mimetic ABT-737 as a chemosensitizer agent of osteosarcoma cells to doxorubicin-induced apoptosis.

Doxorubicin is an anti-cancer drug currently used in the standard treatment of osteosarcoma as well as in other malignancies. [16] Despite its effectiveness, tumor cells frequently develop resistance mechanisms to this drug and the emergence of resistant clones is quite common. [30]

It is established that cancer cells have altered expression of anti and pro-apoptotic proteins belonging to the Bcl-2 family. Those variations interfere with the balance between pro and anti-apoptotic proteins, altering the apoptotic threshold of tumor cells. [29,54] Therefore, targeting the Bcl-2 antiapoptotic proteins appears to be an interesting approach to sensitize cancer cells to apoptosis. BH3 mimetics were designed to inhibit the pro-survival Bcl-2 proteins, thus inducing apoptosis. [54]

In order to explore the potential chemosensitizer effect of the BH3-mimetic ABT-737, we first analyzed the effects of ABT-737 alone on cell viability, in concentrations ranging from 2.5 to 40 $\mu$ M.

Results showed that increasing concentrations ABT-737 induced a decrease in cell viability in a concentration-dependent manner on both cell lines at concentration above or equal to 10 $\mu$ M. For lower concentration the effects were not significant. Based on this observation, we evaluated the chemosensitizer effect of ABT-737 when combined with DOX at different concentrations. Using the MTT assay, we found that ABT-737 potentiates the cytotoxic effect of DOX in both OS cell lines, with a synergic effect observed over the tested concentrations. The same results of synergy were previously described in different types of cancer when combined with different anti-cancer drugs including doxorubicin. [44, 55–57]

After analyzing and comparing the effects on both cell lines, we concluded that ABT-737 decreases cell viability and synergize with doxorubicin in the two cell lines, although the effect is more preminent for MG-63 than in the MNNG/HOS cell line.

Being doxorubicin an apoptosis-induced drug and ABT-737, a drug that target anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family to facilitate cell death, [37] we then evaluated the apoptotic effects of both drugs, alone and in combination, by analyzing the typical morphological cellular alterations induced by apoptosis using the Annexin V/7AAD staining assay by flow cytometry.

We verified that ABT-737 alone, at a concentration of 1  $\mu$ M start to induce first signals of apoptosis, that increased progressively with the drug concentration, and at 10 $\mu$ M the

percentage of early and late apoptotic cells was of 53.9% and 29.2%, respectively, demonstrating the ability of this new drug in inducing apoptotic cell death. These results are in accordance with reported data in other tumor cell lines. [55, 57, 58] Importantly, when co-incubated with DOX, ABT-737 at the lowest concentration (1  $\mu$ M) was able to potentiate the cytotoxicity of DOX in the MG-63 cell line. In fact, the percentage of cells undergoing apoptosis in DOX-treated cells that was of  $9.43 \pm 0.73\%$  increased significantly to  $23.77 \pm 1.64\%$  when in combination with ABT-737. It is interesting that both drugs used as single-agents at 1  $\mu$ M, modestly induced apoptosis, eliciting mainly a cytostatic effect. The substantial increased efficacy achieved with both drugs, is probably explained by the ability of ABT-737 to target the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, thus facilitating cell death by apoptosis.

The MNNG/HOS cell line was less responsive to this therapeutic approach, since it was necessary to double the concentrations of both drugs to achieve the same effect seen on the MG-63 cell line. Results from cell viability and apoptosis induction assays are consistent with the previous observation of the lower sensitivity of MNNG/HOS cell line to ABT-737, either alone or combined with DOX, which leads to the hypothesis of a more resistant phenotype for this cell line.

Alterations on the expression of proteins from the Bcl-2 family appear to be related to the occurrence of resistance to BH3-mimetics. In 2006, van Delf *et al.* found that ABT-737 bind with high affinity to Bcl-2 and Bcl-xL, but not to Mcl-1. Furthermore, they determined that increased expression of Bcl-2 and Bcl-xL didn't confer resistance to ABT-737, but proved that Mcl-1 does, and that its neutralization lead to a more efficient Bak/Bax-mediated killing. [40] Those findings were further confirmed by several studies that observed that the overexpression of Mcl-1 conferred resistance to ABT-737. Several groups described that balance Mcl-1/NOXA plays an important role in ABT-737 in various cancer cell lines, with the downregulation of Mcl-1 and the up-regulation of NOXA resulting in synergic effects with ABT-737 [59,60] Del Gaizo Moore *et al.* refer to Bim as a factor of sensitivity to ABT-737 induced cell death. [39] The hypothesis was pursued by other groups, that confirmed that ABT-737 was able to displace Bim from Bcl-2 and Bcl-xL, but not from Mcl-1 [60] and also that ABT-737 activity could be regulated from Bim, although dependent of low NOXA expression levels. [61] On the other hand, regulation of NOXA plays a critical role on ABT-737 induced death independent of Bim. [61]

Further studies would be important regarding the expression levels of both Mcl-1 and NOXA on both cell lines as a possible explanation for the lower sensitivity of MNNG/HOS cells to ABT-737. Also, studies using isolated CSC from both cell lines would be crucial to understand their sensitivity to ABT-737. CSC are more resistance to chemotherapeutics that

differentiated cells [26] and one of the described resistance mechanisms is the increased apoptotic threshold due to the increased expression of anti-apoptotic proteins. [31] This increase on anti-apoptotic protein's expression has been described in CSC from several types of solid tumors [62–64] The use of ABT-737 has been described to sensitize CSC to apoptosis and chemotherapeutic agents. [62,63,65,66] Gibbs *et al.* described for the first time the isolation of a subpopulation of self-renewing cells with stem-like properties in osteosarcoma. [67]. In 2012, our group also described the presence of CSCs and demonstrated that they are more resistant to conventional therapy than their differentiated counterparts. [68] Another study confirmed that spheres isolated from MNNG/HOS parental cells had increased expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL and down-regulation of pro-apoptotic proteins Bak. [69] Keeping in mind all the information gathered on the activity of ABT-737 on CSC and the undoubtable existence of this cell subpopulation on OS, the inhibition of anti-apoptotic proteins using the BH3-mimetic ABT-737, could be envisaged as a promising approach to overcome apoptosis resistance mechanisms operating in CSC.

Previous studies already published by our group demonstrate that DOX at non-cytotoxic concentration leads to an enrichment of CSCs in osteosarcoma through activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and up-regulation of pluripotency related genes Nanog, KLF4, SOX2 and OCT4, which are common stemness regulators. regulating stemness. [70,71] With this in mind, we decided to evaluate if ABT-737 might modulate the expression of some of these pluripotency related genes or to prevent the up-regulation induced by DOX.

We started to analyze the effect of DOX on the expression of pluripotency related genes and verified that in the MNNG/HOS cells, up-regulates the expression of KLF4 and SOX2 but not of OCT4 genes, which is consistent with previous results published by our group [71] Concerning the MG-63 cell line, treatment with DOX induced up-regulation of all pluripotency related genes tested, which is consistent with previously unpublished results from our group.

ABT-737 *per se* did not affect the expression of pluripotency related genes tested with the exception of KLF4 in MNNG/HOS cells, neither prevented the up-regulation induced by DOX in both cell lines.

These results, although preliminary confirmed the efficacy of ABT-737 on sensitizing osteosarcoma cells to DOX, mainly as a result of its specific targeted activity on anti-apoptotic BCL-2 proteins. However further studies are needed to confirm these findings.

## **5. Conclusion and future perspectives**

The aim of this study was to explore the effect of the BH3-mimetic ABT-737 on chemosensitizing osteosarcoma cells to standard treatment with doxorubicin.

Our studies performed in two osteosarcoma cell lines demonstrated that ABT-737 decreased cell viability and potentiated the cytotoxic effects of doxorubicin, revealing a synergistic effect between both drugs.

We demonstrated that co-treatment with cytostatic concentrations of ABT-737 and doxorubicin decreased cell death by induction of apoptosis, which is the target of BH3-mimetics.

Altogether, these results suggest that the combination of doxorubicin with ABT-737 might be an effective treatment approach to OS, in order overcome DOX-induced resistance and to reduce the dose of doxorubicin along with the aggressive side effects.

Further studies regarding the effect of ABT-737 on the expression of Bcl-2 pro and anti-apoptotic proteins would be important to better understand the mechanism of action of ABT-737. Characterization of the expression of Mcl-1 and NOXA before and after treatment would also be important to evaluate the possible existence of a resistant profile. Since CSC represent a major concern for OS chemoresistance and recurrence and seem to be an important target for BH3-mimetics, studies to evaluate the effects of ABT-737 on this cell subpopulation would be crucial to benefit from this important synergic effect between DOX and ABT-737 and overcome the highly resilience of CSC to doxorubicin.

## References

- 1 - DURFEE, R. A., MOHAMMED, M. and LUU, H. H. **Review of Osteosarcoma and Current Management.** Rheumatol. Ther., 3 (2016) 221–243.
- 2 - MIRABELLO, L., TROISI, R. J. and SAVAGE, S. A. **International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons.** Int J Cancer, 125 (2011) 229–234.
- 3 - SHULMAN, L. N. and TORODE, J. **2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines - Osteosarcoma.** (2014) 1–10.
- 4 - SAVAGE, S. A. and MIRABELLO, L. **Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology.** Sarcoma, (2011) 14–16.
- 5 - ABARRATEGI, A., TORNIN, J., LUCIA, M. C., HAMILTON, A., ENRIQUE, M. C., RODRIGO, J. P., GONZÁLEZ, M. V., BALDINI, N., JAVIER, G. C. and RODRIGUEZ, R. **Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer stem cells, and targeted therapies.** Stem Cells Int., (2016).
- 6 - FRAUMENI, J. F. **Stature and malignant tumors of bone in childhood and adolescence.** Cancer, 20 (1967) 967–973.
- 7 - MIRABELLO, L., PFEIFFER, R., MURPHY, G., DAW, N. C., PATIÑO-GARCIA, A., TROISI, R. J., HOOVER, R. N., DOUGLASS, C., SCHÜZ, J., CRAFT, A. W. and SAVAGE, S. A. **Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma.** Cancer Causes Control, 22 (2011) 899–908.
- 8 - CHOONG, P. F. M., BROADHEAD, M. L., CLARK, J. C. M., MYERS, D. E. and DASS, C. R. **The molecular pathogenesis of osteosarcoma: A review.** Sarcoma, (2011).
- 9 - CALVERT, G. T., RANDALL, R. L., JONES, K. B., CANNON-ALBRIGHT, L., LESSNICK, S. and SCHIFFMAN, J. D. **At-Risk Populations for Osteosarcoma: The Syndromes and Beyond.** Sarcoma, (2012) 1–9.
- 10 - MARTIN, J. **Genetics of osteosarcoma.** Osteosarcoma, (2012) 3–17.
- 11 - TANG, N., SONG, W. X., LUO, J., HAYDON, R. C. and HE, T. C. **Osteosarcoma development and stem cell differentiation.** Clin. Orthop. Relat. Res., 466 (2008) 2114–2130.
- 12 - GIBBS, C. P., LEVINGS, P. P. and GHIVIZZANI, S. C. **Evidence for the osteosarcoma stem cell.** Curr. Orthop. Pract., 22 (2011) 322–326.
- 13 - MUTSAERS, A. J. and WALKLEY, C. R. **Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells?** Bone, 62 (2014) 56–63.
- 14 - MOHENY, A. B. and SZUHAI, K. **Osteosarcoma originates from mesenchymal**

- stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2.** *J. Pathol.*, (2009) 400–409
- 15 - HARRISON, D. J., GELLER, D. S., GILL, J. D., LEWIS, V. O. and GORLICK, R. **Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma.** *Expert Review of Anticancer Therapy* 18 (2018) 39–50.
- 16 - HARRISON, D. J., GELLER, D. S., GILL, J. D., LEWIS, V. O. and GORLICK, R. **Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma.** *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 18 (2018) 39–50.
- 17 - TACAR, O., SRIAMORNSAK, P. and DASS, C. R. **Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems.** *J. Pharm. Pharmacol.*, 65 (2013) 157–170.
- 18 - THORN, CAROLINE; OSHIRO, CONNIE; MARSH, SHARON; HERNANDEZ-BOUSSARD, TINA; MCLEOD, HOWARD; KLEIN, TERI; ALTMAN, R. **Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.** *Pharmacogenet Genomics*, 21 (2012) 440–446.
- 19 - TAHOVER, E., PATIL, Y. P. and GABIZON, A. A. **Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: Focus on liposomes.** *Anticancer. Drugs*, 26 (2015) 241–258.
- 20 - GALLUZZI, L., VITALE, I., MICHELS, J., BRENNER, C., SZABADKAI, G., HAREL-BELLAN, A., CASTEDO, M. and KROEMER, G. **Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future.** *Cell Death Dis.*, 5 (2014) e1257–18.
- 21 - HARRISON, D. J. and SCHWARTZ, C. L. **Osteogenic Sarcoma: Systemic Chemotherapy Options for Localized Disease.** *Curr. Treat. Options Oncol.*, 18 (2017).
- 22 - GONEN, N. and ASSARAF, Y. G. **Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance.** *Drug Resist. Updat.*, 15 (2012) 183–210.
- 23 - HOWARD, S. C., MCCORMICK, J., PUI, C.-H., BUDDINGTON, R. K. and HARVEY, R. D. **Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate.** *Oncologist*, 21 (2016) 1471–1482.
- 24 - HE, H., NI, J. and HUANG, J. **Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (review).** *Oncol. Lett.*, 7 (2014) 1352–1362.
- 25 - HAMILTON, G. and RATH, B. **A short update on cancer chemoresistance** **Chemoresistenz bei Tumorerkrankungen – eine aktuelle Übersicht.** *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164 (2014) 456–460.
- 26 - NIKOLAOU, M., PAVLOPOULOU, A., GEORGAKILAS, A. G. and KYRODIMOS, E. **The**

- challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview.** Clin. Exp. Metastasis, 35 (2018) 309–318.
- 27 - PATEL, N. R., PATTNI, B. S., ABOUZEID, A. H. and TORCHILIN, V. P. **Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer.** Adv. Drug Deliv. Rev., 65 (2013) 1748–1762.
- 28 - HOUSMAN, G., BYLER, S., HEERBOTH, S., LAPINSKA, K., LONGACRE, M., SNYDER, N. and SARKAR, S. **Drug resistance in cancer: An overview.** Cancers (Basel), 6 (2014) 1769–1792.
- 29 - KALEIGH, F. **Evading apoptosis in cancer.** Bone, 23 (2008) 1–7.
- 30 - MARTINS-NEVES, S. R., CLETON-JANSEN, A. M. and GOMES, C. M. F. **Therapy-induced enrichment of cancer stem-like cells in solid human tumors: Where do we stand?** Pharmacol. Res., 137 (2018) 193–204.
- 31 - COLAK, S. and MEDEMA, J. P. **Cancer stem cells - Important players in tumor therapy resistance.** FEBS J., 281 (2014) 4779–4791.
- 32 - MATSUURA, K., CANFIELD, K., FENG, W. and KUROKAWA, M. **Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer.** Int. Rev. Cell Mol. Biol., 327 (2016) 43–87.
- 33 - CORREIA, C., LEE, S. H., MENG, X. W., VINCELETTE, N. D., KNORR, K. L. B., DING, H., NOWAKOWSKI, G. S., DAI, H. and KAUFMANN, S. H. **Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment.** Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res., 1853 (2015) 1658–1671.
- 34 - DEL GAIZO MOORE, V. and LETAI, A. **BH3 profiling – measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions Victoria.** Bone, 23 (2008) 1–7.
- 35 - MONTERO, J. and LETAI, A. **Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic?** Cell Death Differ., 25 (2018) 56–64.
- 36 - OPYDO-CHANEK, M., GONZALO, O. and MARZO, I. **Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects.** Biochem. Pharmacol., 136 (2017) 12–23.
- 37 - OLTERS DORF, T., ELMORE, S., SHOEMAKER, A., ARMSTRONG, R. C., AUGERI, D. J., BELLI, B. A., BRUNCKO, M., DECKWERTH, T. L., DINGES, J., HAJDUK, P. J., JOSEPH, M. K., KITADA, S., KORSMEYER, S. J., KUNZER, A. R., LETAI, A., LI, C., MITTEN, M. J., NETTESHEIM, D. G., NG, S. C., NIMMER, P. M., O'CONNOR, J. M., OLEKSIJEV, A., PETROS, A. M., REED, J. C., SHEN, W., TAHIR, S. K., THOMPSON, C. B., TOMASELLI, K. J., WANG, B., WENDT, M. D., ZHANG, H., FESIK, S. W., ROSENBERG, S. H. **An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours.** Nature, 435 (2005) 677–681.



- 38 - DELBRIDGE, A. R. D. and STRASSER, A. **The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy.** *Cell Death Differ.*, 22 (2015) 1071–1080.
- 39 - DEL, V., MOORE, G., BROWN, J. R., CERTO, M., LOVE, T. M., NOVINA, C. D. and LETAI, A. **Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737.** *117* (2007).
- 40 - VAN DELFT, M. F., WEI, A. H., MASON, K. D., VANDENBERG, C. J., CHEN, L., CZABOTAR, P. E., WILLIS, S. N., SCOTT, C. L., DAY, C. L., CORY, S., ADAMS, J. M., ROBERTS, A. W. and HUANG, D. C. S. **The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized.** *Cancer Cell*, 10 (2006) 389–399.
- 41 - BEURLET, S., OMIÐVAR, N., GOROMBEI, P., KRIEF, P., LE POGAM, C., SETTERBLAD, N., DE LA GRANGE, P., LEBOEUF, C., JANIN, A., NOGUERA, M., HERVATIN, F., SARDA-MANTEL, L., KONOPLEVA, MICHAEL ANDREEFF, ANDREA W. TU, ALICE C. FAN, DEAN W. FELSHER, ANTHONY WHETTON, M., PLA, M., WEST, R., FENAUX, P., CHOMIENNE, C., and PADUA, R. A. **BCL-2 inhibition with ABT-737 prolongs survival in an NRAS/BCL-2 mouse model of AML by targeting primitive LSK and progenitor cells.** *Blood*, 122 (2013) 2864–2876.
- 42 - NOLL, T., SCHULTZE-SEEMANN, S., KUCKUCK, I., MICHALSKA, M. and WOLF, P. **Synergistic cytotoxicity of a prostate cancer-specific immunotoxin in combination with the BH3 mimetic ABT-737.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 67 (2018) 413–422.
- 43 - KASAI, S., SASAKI, T., WATANABE, A., NISHIYA, M., YASUHIRA, S., SHIBAZAKI, M. and MAESAWA, C. **Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737 sensitizes pancreatic ductal adenocarcinoma to paclitaxel-induced cell death.** *Oncol. Lett.*, 14 (2017) 903–908.
- 44 - DE WOLF, E., DE WOLF, C. and RICHARDSON, A. **ABT-737 and pictilisib synergistically enhance pitavastatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells.** *Oncol. Lett.*, 15 (2018) 1979–1984.
- 45 - HWANG, E., HWANG, S.-H., KIM, J., PARK, J. H., OH, S., KIM, Y. A. and HWANG, K.-T. **ABT-737 ameliorates docetaxel resistance in triple negative breast cancer cell line.** *Ann. Surg. Treat. Res.*, (2018).
- 46 - SYLVESTER, P. W. **Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability.** *Methods Mol. Biol.*, (2011).
- 47 - ZIMMERMANN, M. and MEYER, N. **Annexin V/7-AAD Staining in Keratinocytes.** *Methods Mol. Biol.*, 740 (2011) 57–63.
- 48 - ZEMBRUSKI, N. C. L., STACHE, V., HAEFELI, W. E. and WEISS, J. **7-Aminoactinomycin D**

- for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal. Biochem.*, 429 (2012) 79–81
- 49 - CHOU, T. C. **Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies.** *Pharmacological Reviews* (2006).
- 50 - BACHMAN, J. **Reverse-transcription PCR (RT-PCR).** *Methods in Enzymology* 530. Elsevier, Inc., 2013. ISBN: 978-0-12-420037-1. p. 67–74.
- 51 - WAGNER, E. M. **Chapter 2 Monitoring Gene Expression: Quantitative.** 1027 (2013) 19–45.
- 52 - MARTINS-NEVES, S. R., CORVER, W. E., PAIVA-OLIVEIRA, D. I., VAN DEN AKKER, B. E. W. M., BRIARE-DE-BRUIJN, I. H., BOVÉE, J. V. M. G., GOMES, C. M. F. and CLETON-JANSEN, A. M. **Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ $\beta$ -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4.** *J. Cell. Physiol.*, 231 (2016) 876–886.
- 53 - FERREIRA-TEIXEIRA, M., PARADA, B., RODRIGUES-SANTOS, P., ALVES, V., RAMALHO, J. S., CARAMELO, F., SOUSA, V., REIS, F. and GOMES, C. M. **Functional and molecular characterization of cancer stem-like cells in bladder cancer: A potential signature for muscle-invasive tumors.** *Oncotarget*, 6 (2015) 36185–36201.
- 54 - CAMPBELL, K. J. and TAIT, S. W. G. **Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer.** *Open Biol.*, 8 (2018) 1–11.
- 55 - BROECKER-PREUSS, M., BECHER-BOVELETH, N., MÜLLER, S. and MANN, K. **The BH3 mimetic drug ABT-737 induces apoptosis and acts synergistically with chemotherapeutic drugs in thyroid carcinoma cells.** *Cancer Cell Int.*, 16 (2016) 1–12.
- 56 - TOUZEAU, C., DOUSSET, C., BODET, L., GOMEZ-BOUGIE, P., BONNAUD, S., MOREAU, A., MOREAU, P., PELLAT-DECEUNYK, C., AMIOT, M. and LE GOUILL, S. **ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a Bcl-2 high/Mcl-1 low profile and synergizes with other antineoplastic agents.** *Clin. Cancer Res.*, 17 (2011) 5973–5981.
- 57 - RAATS, D. A. E., DE BRUIJN, M. T., STELLER, E. J. A., EMMINK, B. L., BOREL-RINKES, I. H. M. and KRANENBURG, O. **Synergistic killing of colorectal cancer cells by oxaliplatin and ABT-737.** *Cell. Oncol.*, 34 (2011) 307–313.
- 58 - FANG, H., HARNED, T. M., KALOUS, O., MALDONADO, V., DECLERCK, Y. A. and REYNOLDS, C. P. **Synergistic activity of fenretinide and the Bcl-2 family protein inhibitor ABT-737 against human neuroblastoma.** *Clin. Cancer Res.*, 17 (2011) 7093–7104.
- 59 - TROMP, J. M., GEEST, C. R., BREIJ, E. C. W., ELIAS, J. A., VAN LAAR, J., LUIJKS, D. M., KATER, A. P., BEAUMONT, T., VAN OERS, M. H. J. and ELDERING, E. **Tipping the Noxa/Mcl-1**

- balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia.** Clin. Cancer Res., 18 (2012) 487–498.
- 60 - ROOSWINKEL, R. W., VAN DE KOOIJ, B., VERHEIJ, M. and BORST, J. **Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B.** Cell Death Dis., 3 (2012) e366–10.
- 61 - NAKAJIMA, W., HICKS, M. A., TANAKA, N., KRYSTAL, G. W. and HARADA, H. **Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer.** Cell Death Dis., 5 (2014) e1052–10.
- 62 - COLAK, S., ZIMBERLIN, C. D., FESSLER, E., HOGDAL, L., PRASETYANTI, P. R., GRANDELA, C. M., LETAI, A. and MEDEMA, J. P. **Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells.** Cell Death Differ., 21 (2014) 1170–1177.
- 63 - ZEUNER, A., FRANCESCANGELI, F., CONTAVALLI, P., ZAPPARELLI, G., APUZZO, T., ERAMO, A., BAIOCCHI, M., DE ANGELIS, M. L., BIFFONI, M., SETTE, G., TODARO, M., STASSI, G. and DE MARIA, R. **Elimination of quiescent/slow-proliferating cancer stem cells by Bcl-XL inhibition in non-small cell lung cancer.** Cell Death Differ., 21 (2014) 1877–1888.
- 64 - COLAK, S. and MEDEMA, J. P. **Human colonic fibroblasts regulate stemness and chemotherapy resistance of colon cancer stem cells.** Cell Cycle, 15 (2016) 1531–1537.
- 65 - GILORMINI, M., MALESYS, C., ARMANDY, E., MANAS, P., GUY, J.-B., MAGNÉ, N., RODRIGUEZ-LAFRASSE, C. and ARDAIL, D. **Preferential targeting of cancer stem cells in the radiosensitizing effect of ABT-737 on HNSCC.** Oncotarget, 7 (2016).
- 66 - TAGSCHERER, K. E., FASSL, A., CAMPOS, B., FARHADI, M., KRAEMER, A., BÖCK, B. C., MACHER-GOEPFINGER, S., RADLWIMMER, B., WIESTLER, O. D., HEROLD-MENDE, C. and ROTH, W. **Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins.** Oncogene, 27 (2008) 6646–6656.
- 67 - GIBBS, C. P., KUKKOV, V. G., REITH, J. D., TCHIGRINOVA, O., SUSLOV, O. N., SCOTT, E. W., GHIVIZZANI, S. C., IGNATOVA, T. N. and STEINDLER, D. A. **Stem-like cells in bone sarcomas: Implications for tumorigenesis.** Neoplasia, 7 (2005) 967–976.
- 68 - MARTINS-NEVES, S. R., LOPES, Á. O., DO CARMO, A., PAIVA, A. A., SIMÕES, P. C., ABRUNHOSA, A. J. and GOMES, C. M. F. **Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line.** BMC Cancer, 12 (2012).

- 69 - GONÇALVES, C., MARTINS-NEVES, S. R., PAIVA-OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, V. E. B., FONTES-RIBEIRO, C. and GOMES, C. M. F. **Sensitizing osteosarcoma stem cells to doxorubicin-induced apoptosis through retention of doxorubicin and modulation of apoptotic-related proteins.** *Life Sci.*, 130 (2015) 47–56.
- 70 - CAI, Y., MOHSENY, A. B., KARPERIEN, M., HOGENDOORN, P. C., ZHOU, G. and CLETON-JANSEN, A. M. **Inactive Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma Yongping.** *J. Pathol.*, 210 (2013) 103–110.
- 71 - MARTINS-NEVES, S. R., PAIVA-OLIVEIRA, D. I., WIJERS-KOSTER, P. M., ABRUNHOSA, A. J., FONTES-RIBEIRO, C., BOVÉE, J. V. M. G., CLETON-JANSEN, A. M. and GOMES, C. M. F. **Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling.** *Cancer Lett.*, 370 (2016) 286–295.