



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Joana Beatriz Marouvo Marques

POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS  
INIBIDORES DA PARP COMO ABORDAGEM  
TERAPÊUTICA CONTRA O CANCRO DO  
PÂNCREAS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica, com especialização em Imagem e Radiação orientada pela Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e coorientada pelo Mestre Eurico José Gonçalves Pereira, apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

setembro de 2023



Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

# Potenciação da atividade dos inibidores da PARP como abordagem terapêutica contra o cancro do pâncreas

Joana Beatriz Marouvo Marques

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica, com especialização em Imagem e Radiação orientada pela Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e coorientada pelo Mestre Eurico José Gonçalves Pereira, apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



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

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



## Agradecimentos

A realização deste projeto marca a conclusão do meu percurso académico, percurso esse que se iniciou há cinco anos e que foi pautado não só por esforço e dedicação individual, como também pelo contributo de todas as pessoas que comigo se cruzaram ao longo deste tempo, direta ou indiretamente. Assim, gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos à equipa multidisciplinar que permitiu que a elaboração desta dissertação fosse possível.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e diretora do Instituto de Biofísica, por me ter permitido realizar esta dissertação neste local e por fazer parte do seu grupo de trabalho. Agradeço, ainda, por toda a partilha de conhecimento, pelo rigor científico inculcado e pelo tempo despendido na revisão deste documento, que em muito contribuiu para o resultado aqui apresentado.

À Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora desta dissertação, obrigada por ter aceitado, desde cedo, a função de me orientar ao longo deste ano. Agradeço, sobretudo, a sua constante disponibilidade, a forma simples e acessível com que sempre partilhou o seu conhecimento e por todas as críticas construtivas e sugestões feitas durante a revisão desta dissertação. Os meus mais sinceros agradecimentos pela oportunidade em trabalhar perto de si, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação e pela imensa partilha de ensinamentos, quer profissionais quer pessoais.

Ao Mestre Eurico Pereira, coorientador desta dissertação, pela sua presença fundamental e imprescindível ao longo deste ano. Agradeço por todos os ensinamentos transmitidos, principalmente no início do projeto, que contribuíram, em grande parte, para aquilo que sei hoje. Obrigada pela muita paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas e pela ajuda e disponibilidade constantes, quer esta fosse nas tarefas mais simples de laboratório, quer fosse na realização de todas as partes que integram esta dissertação. Acima de tudo, agradeço pelo facto de saber sempre qual o rumo a seguir.

Ao serviço de radioterapia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, nomeadamente ao Especialista em Física Médica Paulo César Simões, pela constante prontidão em disponibilizar do seu tempo e serviço para que a irradiação das células fosse possível. Agradeço, ainda, os conhecimentos técnicos transmitidos e todas as dúvidas esclarecidas.

À unidade de preparação de citoestáticos/citotóxicos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela gentileza em terem cedido todos os agentes de quimioterapia usados ao longo deste trabalho experimental.

Aos Mestres Ana Rita Gomes, Beatriz Serambeque, Catarina Ferreira, Inês Marques e Ricardo Teixo, por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, pela paciência e disponibilidade constante para ajudar no que fosse preciso em termos laboratoriais e pela convivência ao longo deste ano.

A todos os alunos que foram parte integrante deste projeto durante o ano, através dos seus projetos de licenciatura ou de rotações laboratoriais, pela sua preciosa ajuda durante alguns dos procedimentos laboratoriais.

À Beatriz, à Sara e à Sofia por serem as pessoas que Coimbra se encarregou de colocar no meu caminho, por todos os momentos que vivemos juntas ao longo destes 5 anos, pelas muitas conversas, momentos de diversão e, também, por todo o apoio de que me deram. Obrigada pela vossa amizade!

À Carolina, por toda a ajuda e orientação que me deu desde que cheguei a este curso, à Gabriela, por ser a presença mais assídua ao meu lado nestes últimos 4 anos, e à Francisca, por ser alguém que mesmo à distância continua a fazer sentir a sua presença. Agradeço, acima de tudo, a vossa amizade e todos os momentos bonitos que passámos juntas.

Às minhas fiéis companheiras de laboratório: Rafaela, umas das maiores surpresas deste ano, Diana e Daniela, que para além de partilharem os anteriores 4 anos, partilharem este de forma ainda mais especial; o meu muito obrigada por terem sido a melhor companhia que podia ter tido ao longo deste último ano, pela alegria constante, pelos nossos muitos momentos de convívio e por toda a ajuda e companheirismo. Têm todas um lugar especial na minha vida!

A todos os membros, que fazem ou já fizeram parte, da equipa de animação da Associação de Jovens de Soure, por acompanharem de perto este meu percurso e pela alegria, momentos de diversão e aventura que tanto nos caracterizam.

A todos aqueles que considero família, principalmente a todos os meus tios e padrinhos, por todo o orgulho que sei que têm em mim e pela felicidade em me verem terminar esta etapa. Obrigada por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

À Rita e ao Diogo, por serem o mais próximo de irmãos que tenho, por estarem lá desde sempre na minha vida a partilhar todos os momentos ao meu lado e por contribuírem, em muito, para a minha felicidade.

E por último, o meu maior agradecimento aos meus pais: Isabel e Fernando. Obrigada pelo vosso muito esforço, sacrifício e dedicação, para que eu pudesse seguir este percurso académico. Obrigada por fazerem de mim aquilo que sou hoje e por me terem incutido, desde cedo, o espírito de dedicação e trabalho. O culminar desta etapa em muito se deve a vocês, por isso, um simples obrigado nunca será suficiente!



## Resumo

O cancro do pâncreas é um dos tipos de cancro com maior taxa de mortalidade a nível mundial, o que se justifica pela sua progressão assintomática e disseminação metastática precoce, bem como pelo seu diagnóstico em estádios avançados e pela inexistência de abordagens terapêuticas eficazes. A cirurgia constitui a única opção potencialmente curativa, sendo apenas realizada quando o tumor é considerado ressecável, o que perfaz 15 a 20% dos casos diagnosticados. A quimioterapia é a opção terapêutica mais utilizada para estádios avançados da doença, principalmente através da administração do regime *FOLFIRINOX*, da combinação de gemcitabina com nab-paclitaxel ou de gemcitabina em monoterapia. Contudo, estes agentes de quimioterapia proporcionam um baixo benefício aos doentes, pelo que o surgimento de novas e eficazes abordagens terapêuticas se torna extremamente necessário. O inibidor da PARP olaparib, terapia antineoplásica direcionada que impede a reparação de danos no DNA, já se encontra aprovado para o tratamento do cancro do pâncreas, mas apenas em casos muito específicos.

Desta forma, o principal objetivo desta dissertação foi avaliar o potencial da combinação de olaparib com diferentes *DNA-damaging agents* (gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina ou 5-fluorouracilo) ou radioterapia de fonte externa, tanto num regime de combinação simultânea como sequencial, com a finalidade de aferir o potencial efeito sinérgico das combinações. A citotoxicidade associada à combinação de olaparib e *DNA-damaging agents* na linha celular MIA PaCa-2, nos diferentes regimes, foi determinada através da avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB. Por outro lado, os efeitos da combinação de olaparib com radioterapia de fonte externa para a mesma linha celular foram determinados através da avaliação da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico. O método estabelecido por *Chou* e *Talalay* foi utilizado para classificar os efeitos observados em cada combinação.

Os resultados obtidos para a combinação de olaparib com *DNA-damaging agents* denotam a obtenção de um efeito sinérgico no caso da combinação com irinotecano, tendo sido este efeito sinérgico mais pronunciado no regime em que o olaparib foi administrado 24h depois do agente de quimioterapia. Para além desta, também a combinação em que o olaparib é administrado 24h depois da oxaliplatina, com um período de incubação de 48h e 72h, respetivamente, demonstrou possuir um efeito ligeiramente sinérgico, resultados esses que corroboram o regime para o qual o olaparib já se encontra aprovado para o tratamento do cancro do pâncreas. No que diz respeito à combinação de olaparib com radioterapia, não foi obtido um efeito sinérgico para nenhum dos regimes considerados. No entanto, ficou evidenciado o potencial radiosensibilizador do olaparib na linha celular MIA PaCa-2, uma vez

que este providenciou uma redução da dose absorvida, quando comparado com o regime de radioterapia em monoterapia.

Em suma, este trabalho reforça o potencial da combinação de olaparib com irinotecano ou oxaliplatina (regime sequencial), bem como o efeito radiosensibilizador do olaparib como futuras abordagens terapêuticas para o cancro do pâncreas. De forma a aproximar estes resultados da prática clínica demarca-se a importância da existência de novos estudos, capazes de avaliar o potencial destas combinações, pela compreensão dos mecanismos de ação subjacentes.

**Palavras-chave:** Cancro do pâncreas, inibidores da PARP, quimioterapia e radioterapia.

## Abstract

Pancreatic cancer has one of the highest mortality rates among cancer types worldwide. This is attributed to its asymptomatic progression, early metastatic spread, advanced-stage diagnosis, and the absence of effective therapeutic approaches. Surgery offers the only potentially curative option; however, it is only performed when the tumor is deemed resectable, which comprises 15 to 20% of diagnosed cases. For advanced stages of the disease, chemotherapy is the most widely used treatment, primarily involving the administration of the FOLFIRINOX regimen, the combination of gemcitabine with nab-paclitaxel, or gemcitabine as monotherapy. However, these chemotherapeutic agents provide limited benefit to patients, underscoring the necessity for new and effective therapeutic strategies. The PARP inhibitor olaparib, a targeted antineoplastic therapy that prevents DNA damage repair, is approved for the treatment of pancreatic cancer, but only in very specific cases.

Hence, the primary objective of this dissertation was to evaluate the potential of combining olaparib with DNA-damaging agents (gemcitabine, irinotecan, oxaliplatin, or 5-fluorouracil) or external beam radiation therapy, both in simultaneous and sequential combination regimens, to assess the potential synergistic effect of the combinations. Cytotoxicity resulting from the combination of olaparib and DNA-damaging agents in the MIA PaCa-2 cell line under different regimens was assessed by measuring protein content using the SRB assay. In contrast, the impact of combining olaparib with external beam radiation therapy for the same cell line was determined by assessing cell survival via the clonogenic assay. The method established by *Chou* and *Talalay* was used to classify the effects observed in each combination.

The results obtained from the combination of olaparib with DNA-damaging agents demonstrate a synergistic effect, particularly in the case of the combination with irinotecan. This synergistic effect was more pronounced when olaparib was administered 24 hours after the chemotherapeutic agent. Additionally, the combination in which olaparib was administered 24 hours after oxaliplatin, for longer incubation periods, also displayed a slight synergistic effect, supporting the regimen for which olaparib is already approved for pancreatic cancer treatment. Concerning the combination of olaparib with radiotherapy, no synergistic effect was observed for any of the considered regimens. However, olaparib's radiosensitizing potential in the MIA PaCa-2 cell line was demonstrated by reducing the absorbed dose when compared to the radiotherapy regimen used in monotherapy.

In summary, this study reinforces the potential of combining olaparib with irinotecan or oxaliplatin (in a sequential regimen) and highlights olaparib's radiosensitizing effect as a future therapeutic approach for pancreatic cancer. To translate these results into clinical practice, we

emphasize the importance of further studies to evaluate the potential of these combinations, through a deep understanding of their mechanisms of action.

**Keywords:** Pancreatic cancer, PARP inhibitors, chemotherapy, and radiotherapy.

# Índice

Agradecimentos .....	VII
Resumo .....	IX
Abstract.....	XI
Índice de Figuras .....	XVI
Índice de Tabelas.....	XIX
Índice de Equações.....	XXII
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1. Cancro do pâncreas .....	3
1.1.1. Pâncreas .....	3
1.1.2. Epidemiologia .....	4
1.1.3. Fatores de risco .....	5
1.1.4. Diagnóstico .....	6
1.1.5. Tratamento.....	7
1.1.5.1. Tumor maligno ressecável .....	7
1.1.5.2. “ <i>Borderline resectable</i> ” .....	8
1.1.5.3. Localmente avançado .....	8
1.1.5.4. Metastático.....	8
1.2. DNA-damaging agents .....	9
1.2.1. Gemcitabina .....	11
1.2.2. Irinotecano .....	11
1.2.3. Oxaliplatina.....	12
1.2.4. 5-fluorouracilo.....	13
1.3. Inibidores da PARP .....	14
1.3.1. PARP .....	14
1.3.2. Inibidores da PARP.....	14
1.3.3. Utilização do olaparib noutros tipos de cancro .....	17
1.3.4. Resistência aos iPARP .....	17
1.4. Radioterapia .....	18
1.4.1. Princípios físicos .....	18
1.4.2. Radioterapia externa .....	20
1.4.3. Efeitos biológicos.....	21
1.5. Objetivos .....	22
2. Materiais e Métodos .....	25

2.1.	Cultura celular .....	27
2.2.	Fármacos .....	28
2.2.1.	Tratamento com os fármacos em regime de monoterapia .....	29
2.2.2.	Combinações simultâneas .....	30
2.2.3.	Combinações sequenciais.....	31
2.2.4.	Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB.....	32
2.2.5.	Análise estatística .....	33
2.3.	Radioterapia .....	35
2.3.1.	Tratamento com radioterapia em regime de monoterapia .....	36
2.3.2.	Combinações .....	38
2.3.2.1.	Combinação simultânea com concentração de olaparib variável .....	38
2.3.2.2.	Combinação simultânea com concentração fixa de olaparib.....	38
2.3.2.3.	Combinação sequencial com concentração de olaparib variável .....	38
2.3.3.	Avaliação da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico .....	39
2.3.4.	Análise estatística .....	40
3.	Resultados.....	43
3.1.	Avaliação dos efeitos citotóxicos do olaparib e DNA-DA.....	45
3.1.1.	Regime de monoterapia .....	45
3.1.2.	Regime de combinação simultânea .....	46
3.1.2.1.	Olaparib e gemcitabina .....	47
3.1.2.2.	Olaparib e irinotecano .....	48
3.1.2.3.	Olaparib e oxaliplatina.....	49
3.1.2.4.	Olaparib e 5-fluorouracilo.....	49
3.1.3.	Regime de combinação sequencial: olaparib administrado 24h antes do DNA-DA .....	51
3.1.3.1.	Olaparib e gemcitabina.....	51
3.1.3.2.	Olaparib e irinotecano .....	52
3.1.3.3.	Olaparib e oxaliplatina .....	53
3.1.3.4.	Olaparib e 5-fluorouracilo.....	54
3.1.4.	Regime de combinação sequencial: olaparib administrado 24h depois do DNA-DA .....	55
3.1.4.1.	Olaparib e gemcitabina.....	55
3.1.4.2.	Olaparib e irinotecano .....	56
3.1.4.3.	Olaparib e oxaliplatina .....	57
3.1.4.4.	Olaparib e 5-fluorouracilo.....	58
3.2.	Avaliação da sobrevivência celular após tratamento com olaparib e radioterapia externa .....	59

3.2.1.	Regime de monoterapia .....	59
3.2.2.	Regime de combinação simultânea com uma concentração de olaparib variável .....	60
3.2.3.	Regime de combinação simultânea com uma concentração fixa de olaparib ...	62
3.2.4.	Regime de combinação sequencial com uma concentração de olaparib variável . .....	63
4.	Discussão.....	65
5.	Conclusão e Perspetivas Futuras .....	75
6.	Bibliografia .....	79
7.	Anexos.....	87
	Anexo I.....	89
	Anexo II.....	90
	Anexo III.....	91
	Anexo IV .....	92

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação da anatomia do pâncreas e das suas diferentes partes. Adaptado de <sup>3</sup> . .....	3
<b>Figura 2:</b> Representação da formação de ligações cruzadas nas cadeias de DNA. Os grupos alquilo dos agentes alquilantes ligam-se às bases nitrogenadas, especificamente à posição N7 dos resíduos de guanina, o que forma ligações cruzadas, quer estas sejam dentro da mesma cadeia (“Intra-strand crosslinking”) ou entre duas cadeias complementares (“Inter-strand crosslinking”). Retirado de <sup>29</sup> . .....	10
<b>Figura 3:</b> Representação do mecanismo de ação da gemcitabina (dFdC), bem como da sua captação celular. Este composto é metabolizado em nucleósidos difosfato (dFdCDP) e trifosfato (dFdCTP) ativos, pela ação das nucleósido-quinases, o que leva à inibição da síntese de DNA. Retirado de <sup>32</sup> . .....	11
<b>Figura 4:</b> Representação do mecanismo de ação do SN-38, metabolito ativo do irinotecano, através da inibição da topoisomerase I, o que provoca que as SSB originem DSB, devido ao colapso do garfo de replicação. Adaptado de <sup>33</sup> . .....	12
<b>Figura 5:</b> Representação do mecanismo de ação da oxaliplatina, que após o seu processo de internalização forma ligações cruzadas com o DNA, o que culmina em morte celular. Retirado de <sup>35</sup> . .....	13
<b>Figura 6:</b> Representação do mecanismo de ação do 5-fluorouracilo. Por ser um composto análogo ao uracilo é transportado para o interior da célula, onde é metabolizado, dando origem fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), que se liga à enzima timidilato sintetase (TS), inibindo a desoxitimidina monofosfato (dTMP). Isto leva à indução de danos no DNA. Adaptado de <sup>38</sup> . .....	13
<b>Figura 7:</b> Representação da ação dos iPARP. Estes têm dois efeitos distintos que são a inibição catalítica da PARP, o que impede a reparação das SSB, ou o seu aprisionamento nesse local. Isto leva à conversão de SSB em DSB, o que origina dois cenários: a reparação do DNA, com consequente sobrevivência celular, caso a célula possua as vias de reparação por HR funcionais, ou seja, não possua mutações nos genes BRCA1/2; ou a incapacidade de reparação de danos no DNA, com consequente morte celular, caso a célula não possua as vias de reparação por HR funcionais, o que faz com que tenha de optar pelo mecanismo NHEJ, mais suscetível a erros. Retirado de <sup>41</sup> . .....	15
<b>Figura 8:</b> Representação do sistema de radioterapia TrueBeam®. Retirado de <sup>52</sup> . .....	20
<b>Figura 9:</b> Representação do acelerador linear bem como do equipamento utilizado durante o processo de irradiação. ....	36
<b>Figura 10:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de monoterapia com olaparib (a), gemcitabina (b), irinotecano (c), oxaliplatina (d) ou 5-fluorouracilo (e), 24h (azul), 48h (cinzento) e 72h (preto) após a administração do fármaco. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	45



<b>Figura 11:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com gemcitabina, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	47
<b>Figura 12:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com irinotecano, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	48
<b>Figura 13:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com oxaliplatina, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	49
<b>Figura 14:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com 5-fluorouracilo, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 3 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	50
<b>Figura 15:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com gemcitabina, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	51
<b>Figura 16:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com irinotecano, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	52
<b>Figura 17:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com oxaliplatina, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	53
<b>Figura 18:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com 5-fluorouracilo, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	54
<b>Figura 19:</b> Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de gemcitabina com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. ....	56

- Figura 20:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de irinotecano com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 3 experiências independentes realizadas em triplicado. .... 57
- Figura 21:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de oxaliplatina com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado. .... 58
- Figura 22:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de 5-fluorouracilo com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 3 experiências independentes realizadas em triplicado. .... 59
- Figura 23:** Curvas de sobrevivência obtidas após o tratamento, num regime de monoterapia, com radioterapia externa (a) ou olaparib (b). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média  $\pm$  erro-padrão) em função da dose, em Gy (a) e em função do logaritmo da concentração utilizada, em  $\mu\text{M}$  (b), de pelo menos, 4 experiências em duplicado. .... 60
- Figura 24:** Curva de sobrevivência obtida após o tratamento, num regime de combinação simultânea, com radioterapia externa e olaparib. Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média  $\pm$  erro-padrão) em função da dose, em Gy, e em função da concentração de fármaco utilizada, em  $\mu\text{M}$ , de 4 experiências independentes em duplicado. .... 61
- Figura 25:** Curva de sobrevivência para o tratamento com radioterapia em monoterapia, a cinzento, e para a combinação de radioterapia com 1  $\mu\text{M}$  de olaparib, a azul. Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média  $\pm$  erro-padrão) em função da dose, em Gy, de 4 experiências independentes em duplicado. .... 62
- Figura 26:** Curva de sobrevivência obtida após o tratamento, num regime de combinação sequencial, com radioterapia e olaparib (24h depois). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média  $\pm$  erro-padrão) em função da dose, em Gy, e em função da concentração de fármaco utilizada, em  $\mu\text{M}$ , de 2 experiências independentes em duplicado. .... 64

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Concentrações utilizadas para o tratamento com cada fármaco, num regime de monoterapia. ....	30
<b>Tabela 2:</b> Concentrações de cada fármaco utilizadas no regime de combinações simultâneas.	30
<b>Tabela 3:</b> Concentrações usadas para o regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h antes dos restantes fármacos. ....	31
<b>Tabela 4:</b> Concentrações usadas para o regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h depois dos restantes fármacos.....	32
<b>Tabela 5:</b> Categorização dos efeitos obtidos para uma combinação, de acordo com o CI obtido. Adaptado de <sup>67</sup> . ....	34
<b>Tabela 6:</b> Representação dos valores de dose, em Gy, utilizados e da respetiva quantidade de células semeadas por poço, em que 0 Gy representa a condição controlo.....	37
<b>Tabela 7:</b> Representação dos valores de concentração de olaparib, em $\mu\text{M}$ , utilizados e da respetiva quantidade de células semeadas por poço, em que 0 $\mu\text{M}$ representa a condição controlo e a condição de controlo com veículo. ....	37
<b>Tabela 8:</b> Representação dos valores de dose, em Gy, e da respetiva concentração de olaparib, em $\mu\text{M}$ , utilizados nos regimes de combinação simultânea e sequencial e da respetiva quantidade de células por poço, em que a letra C representa o grupo de Controlo. ....	39
<b>Tabela 9:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib, gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina ou 5-fluorouracilo, bem como dos respetivos $\text{IC}_{95\%}$ e $\text{R}^2$ . ....	46
<b>Tabela 10:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e gemcitabina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos $\text{IC}_{95\%}$ e $\text{R}^2$ . ....	47
<b>Tabela 11:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e irinotecano e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos $\text{IC}_{95\%}$ e $\text{R}^2$ . ....	48
<b>Tabela 12:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e oxaliplatina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos $\text{IC}_{95\%}$ e $\text{R}^2$ . ....	49
<b>Tabela 13:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e 5-fluorouracilo e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos $\text{IC}_{95\%}$ e $\text{R}^2$ . ....	50
<b>Tabela 14:</b> Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de gemcitabina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos $\text{IC}_{95\%}$ e $\text{R}^2$ . ....	52

<b>Tabela 15:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de irinotecano e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> .....	53
<b>Tabela 16:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de oxaliplatina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> .....	54
<b>Tabela 17:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de 5-fluorouracilo e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> .	55
<b>Tabela 18:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração da gemcitabina e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> .....	56
<b>Tabela 19:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do irinotecano e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> .....	57
<b>Tabela 20:</b> Apresentação dos valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração da oxaliplatina e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> .....	58
<b>Tabela 21:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração de 5-fluorouracilo e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> . .....	59
<b>Tabela 22:</b> Valor de IC <sub>50</sub> obtido após a administração isolada de olaparib, bem como o respectivos IC95% e R <sup>2</sup> , e valor de LD <sub>50</sub> obtido após tratamento com radioterapia externa, bem como o respectivos IC95% e R <sup>2</sup> e dos parâmetros que caracterizam o modelo linear quadrático. ....	60
<b>Tabela 23:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e LD <sub>50</sub> obtidos após a combinação de radioterapia com olaparib, do CI e DRI para cada forma de tratamento, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> . ....	61
<b>Tabela 24:</b> Valor de LD <sub>50</sub> obtido após tratamento com radioterapia, tanto em monoterapia como em combinação com 1 µM de olaparib, os respectivos IC95%, R <sup>2</sup> , os parâmetros que caracterizam o modelo linear quadrático e o SER para a combinação. ....	63
<b>Tabela 25:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e LD <sub>50</sub> obtidos após a combinação sequencial de radioterapia com olaparib, do CI e DRI para cada forma de tratamento, bem como dos respectivos IC95% e R <sup>2</sup> ..	64
<b>Tabela 26:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e gemcitabina, bem como após a sua combinação simultânea. ....	89
<b>Tabela 27:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e irinotecano, bem como após a sua combinação simultânea.....	89
<b>Tabela 28:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e oxaliplatina, bem como após a sua combinação simultânea.....	89
<b>Tabela 29:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e 5-fluorouracilo, bem como após a sua combinação simultânea. ....	90
<b>Tabela 30:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de gemcitabina, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	90

<b>Tabela 31:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de irinotecano, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	90
<b>Tabela 32:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de oxaliplatina, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	90
<b>Tabela 33:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de 5-fluorouracilo, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	91
<b>Tabela 34:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de gemcitabina e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	91
<b>Tabela 35:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de irinotecano e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	91
<b>Tabela 36:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de oxaliplatina e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	91
<b>Tabela 37:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de 5-fluorouracilo e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial. ....	92
<b>Tabela 38:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e LD <sub>50</sub> obtidos após o regime de monoterapia de olaparib ou radioterapia de fonte externa, e após a sua combinação simultânea ou sequencial, bem como dos respectivos IC95%. ....	92

## Índice de Equações

<b>Equação 1:</b> Fórmula para o cálculo do índice de combinação de acordo com método de Chou-Talalay.....	33
<b>Equação 2:</b> Fórmula para o cálculo do índice de redução de dose (DRI) de acordo com o método de Chou-Talalay.....	34
<b>Equação 3:</b> Fórmula para o cálculo da incerteza associada ao CI para cada combinação, onde a letra <b>c</b> representa a combinação, a letra <b>m</b> representa o regime de monoterapia e <b>1</b> e <b>2</b> representam os 2 fármacos que constituem a combinação.....	35
<b>Equação 4:</b> Fórmula para o cálculo da incerteza associada ao DRI para cada fármaco na combinação, onde a letra <b>c</b> representa a combinação e a letra <b>m</b> representa o regime de monoterapia. ....	35
<b>Equação 5:</b> Fórmula para o cálculo da eficiência de placa. ....	40
<b>Equação 6:</b> Fórmula para o cálculo do Fator de Sobrevivência.....	40
<b>Equação 7:</b> Expressão que define o modelo linear, em que <b>FS</b> representa o fator de sobrevivência, <b><math>\alpha</math></b> o coeficiente da componente linear, em $\text{Gy}^{-1}$ e <b>D</b> a dose, em Gy.....	40
<b>Equação 8:</b> Expressão que define o modelo linear quadrático, em que <b>FS</b> representa o fator de sobrevivência, <b><math>\alpha</math></b> o coeficiente da componente linear, em $\text{Gy}^{-1}$ , <b><math>\beta</math></b> o coeficiente da componente quadrática, em $\text{Gy}^{-2}$ , e <b>D</b> a dose, em Gy. ....	40
<b>Equação 9:</b> Fórmula para o cálculo do índice de combinação, para as combinações de radioterapia com olaparib.....	41
<b>Equação 10:</b> Fórmula para o cálculo do índice de redução de dose da radioterapia, para as combinações em que esta seja uma das formas de tratamento. ....	41
<b>Equação 11:</b> Fórmula para o cálculo do SER, para a combinação de radioterapia e olaparib a uma concentração fixa.....	41

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- 5-FU: 5-fluorouracilo
- ATCC: *American Type Collection Culture*
- BER: Reparação por excisão de bases
- BRCA1: *Breast cancer susceptibility 1*
- BRCA2: *Breast cancer susceptibility 2*
- CHUC: Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
- CI: Índice de combinação
- CT: Tomografia computadorizada
- DACH: 1,2-diaminociclohexano
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DNA-DA: *DNA damaging agents*
- DRI: Índice de redução de dose
- DSB: Quebra da dupla cadeia
- dTMP: Desoxitimidina monofosfato
- FBS: Soro bovino fetal
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FdUMP: Fluorodesoxiuridina monofosfato
- FS: Fator de sobrevivência
- HER-2: *Human epidermal growth factor receptor-type 2*
- HR: Recombinação homóloga
- IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória média
- IC95%: Intervalo de confiança a 95%
- iPARP: Inibidores da PARP
- LD<sub>50</sub>: Dose letal média
- MLC: *Multi-leaf collimator*
- MRI: Ressonância magnética
- NHEJ: Junção de pontas não-homólogas
- PAR: *poly (ADP-ribose)*
- PARP: *poly (ADP-ribose) polymerase*
- PBS: *Phosphate buffered saline*
- PDAC: Adenocarcinoma ductal pancreático

PE: Eficiência de placa

PET: Tomografia por emissão de positrões

PFS: *Progression free survival*

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação

RNA: Ácido ribonucleico

SER: *Sensitization enhancement ratio*

SRB: *Sulforhodamine B*

SSB: Quebra de uma única cadeia

TS: Enzima timidilato sintetase



# **1. Introdução**

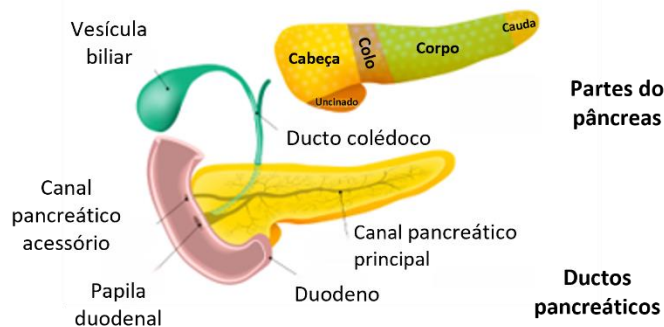


## 1.1. Cancro do pâncreas

As células que existem no organismo estão num processo constante de crescimento e de multiplicação, através do ciclo celular, para fazer face às necessidades fisiológicas de cada indivíduo. O ciclo celular inclui pontos de controlo que permitem às células verificarem a existência de erros e repará-los ou impedir que essa mesma divisão continue. Desta forma, as células que se encontram danificadas interrompem a divisão, para que os erros não se propaguem<sup>1</sup>. Se estes mecanismos não funcionarem de forma correta devido, por exemplo, a modificações genéticas, as células danificadas poderão crescer e multiplicarem-se descontroladamente, dando origem a tumores malignos. Estas células tumorais podem, em estádios avançados da doença, propagar-se para tecidos próximos ou até invadir outros tecidos/órgãos mais distantes, num processo designado por metastização<sup>1</sup>.

### 1.1.1. Pâncreas

O pâncreas é um órgão alongado, com cerca de 15 cm, que possui uma localização retroperitoneal, atrás do estômago, estando situado obliquamente na parede abdominal. Este órgão pode ser dividido anatomicamente em cinco partes, sem que as mesmas tenham uma demarcação concreta: cabeça, processo uncinado, colo, corpo e cauda (Figura 1)<sup>2</sup>.



**Figura 1:** Representação da anatomia do pâncreas e das suas diferentes partes. Adaptado de <sup>3</sup>.

A cabeça constitui a parte mais larga do pâncreas e localiza-se no lado direito do abdómen, estando em contacto direto com o duodeno (partes descendente e horizontal). Para além da divisão já referida, a cabeça pode ainda ser subdividida em duas partes: a cabeça propriamente dita e o processo uncinado. Este último situa-se na parte inferior da cabeça do pâncreas e estende-se até à artéria e veia mesentérica superior. O colo é a parte mais estreita entre a cabeça e corpo do pâncreas, sobrepondo-se aos vasos mesentéricos superiores. O corpo

constitui a maior parte do pâncreas estando situado entre o colo e a cauda do pâncreas. Este é formado por duas superfícies, anterior e posterior, e duas margens, superior e inferior. A porção final do pâncreas designa-se por cauda e localiza-se no lado esquerdo do abdómen, próximo ao hilo do baço. Um parâmetro que permite a distinção entre estas duas últimas estruturas é o facto da cauda se encontrar envolta em peritoneu, enquanto que o mesmo não acontece com o corpo<sup>2,4,5</sup>.

Apesar de ser primeiramente considerado uma glândula exócrina, uma vez que produz enzimas digestivas lançadas para o duodeno através do canal pancreático principal, o pâncreas é também uma glândula endócrina. Isto porque é responsável pela produção de hormonas, que são enviadas diretamente para a corrente sanguínea através da artéria esplénica, entre as quais se salientam a insulina, o glucagon, a gastrina, a somatostatina e o polipeptídeo pancreático<sup>6</sup>.

O termo cancro do pâncreas pode ter origem tanto no tecido exócrino como no endócrino. A forma mais comum deste tipo de cancro é o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, do inglês *pancreatic ductal adenocarcinoma*), o qual resulta de lesões malignas nas células exócrinas do pâncreas que delimitam os canais pancreáticos. Este tipo de cancro constitui cerca de 90% do número total de casos<sup>7</sup>. Com origem no tecido neuroendócrino ou pâncreas endócrino, o carcinoma neuroendócrino é outro tipo de cancro do pâncreas menos frequente, representando cerca de 5% das lesões malignas do pâncreas<sup>8,9</sup>. No contexto deste trabalho, o objeto de estudo apenas incluirá o adenocarcinoma ductal pancreático, excluindo-se, portanto, os tumores neuroendócrinos.

Para além do tecido onde ocorrem as lesões malignas, estas também diferem na localização anatómica. Aproximadamente 60% dos cancros surgem na cabeça do pâncreas, 13% no corpo, 5% na cauda e os restantes 22% dos casos trata-se de carcinomas pancreáticos difusos<sup>10</sup>.

### **1.1.2. Epidemiologia**

O cancro do pâncreas é o 14º tipo de cancro com maior incidência a nível mundial, tendo sido diagnosticados 495 773 novos casos em 2020, de acordo com o *Global Cancer Observatory: Cancer Today*<sup>11,12</sup>. No que diz respeito à mortalidade foram contabilizadas 466 003 mortes no ano de 2020, o que faz com que o número de novos casos seja bastante próximo do número de mortes. Desta forma, o cancro do pâncreas assume-se como o 7º tipo de cancro mais mortal em todo o mundo<sup>11-13</sup>.

A incidência deste tipo de neoplasia é ligeiramente mais elevada no sexo masculino tendo sido contabilizados 246 840 casos no ano de 2020, e 219 163 novos casos no sexo feminino<sup>14</sup>. A incidência é, também, dependente da localização geográfica, uma vez que a Hungria, o Uruguai

e o Japão registaram em 2020 as maiores taxas globais de incidência de cancro do pâncreas<sup>14</sup>. De forma semelhante, e no mesmo ano, as taxas de mortalidade globais foram mais elevadas na Hungria, no Uruguai e na Arménia<sup>14</sup>. Ainda não existe uma razão conhecida para a existência de assimetrias em termos de incidência e de mortalidade nos diferentes países. No entanto, a exposição diferenciada a determinados fatores de risco, o diferente acesso a ferramentas de diagnóstico e a díspar qualidade dos registos podem ter um papel na explicação dessas assimetrias<sup>8,14</sup>.

No que diz respeito a Portugal, só no ano de 2020 foram detetados 1792 novos casos de cancro do pâncreas e contabilizadas 1770 mortes associadas a esta doença, segundo dados do *Global Cancer Observatory: Cancer Today*<sup>11,12</sup>.

Aliado ao facto de a progressão da doença ser maioritariamente assintomática, as ferramentas de diagnóstico existentes são algo inespecíficas, o que faz com que a maioria dos doentes só seja diagnosticada num estágio bastante avançado, onde já se verifica uma disseminação metastática. Neste estágio, as opções mais comuns de tratamento já não são viáveis, o que se concretiza numa taxa de sobrevivência a 5 anos de menos de 5%<sup>13</sup>.

### **1.1.3. Fatores de risco**

É considerado um fator de risco algo que aumente a probabilidade de um indivíduo vir a desenvolver uma qualquer doença, como por exemplo o cancro. No entanto, os fatores de risco podem não ser uma causa direta para o surgimento da doença, uma vez que estes só são identificados em 40% dos casos<sup>15</sup>. Estes fatores podem ser controláveis por cada indivíduo (por exemplo, o consumo de tabaco e de álcool, a obesidade, os fatores dietéticos) sendo designados por modificáveis ou ambientais. Para além destes, é também importante ter em conta os fatores não modificáveis, de entre os quais se salientam a idade, o sexo, a etnia, os fatores genéticos e a história familiar de cancro do pâncreas<sup>8,15</sup>.

O risco de uma pessoa vir a desenvolver cancro do pâncreas aumenta com a idade, pelo que o pico da sua incidência ocorre entre os 60 e os 80 anos, sendo que raramente são detetados casos antes dos 40 anos de idade<sup>8</sup>. Pode, ainda, encontrar-se uma associação entre a diabetes *mellitus* e o desenvolvimento de cancro do pâncreas. Nestes casos, o risco de desenvolver cancro é cerca de 1,8 vezes superior<sup>8</sup>.

Nesta doença, a história familiar tem um papel determinante, já que em 5 a 10% dos casos os doentes reportam ter tido um familiar previamente diagnosticado. Caso haja registo de um caso num familiar próximo (pais, irmãos ou filhos), o risco de um indivíduo vir a desenvolver a doença é 9 vezes superior ao da restante população<sup>8</sup>.

A síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário, um fator genético, pode explicar a origem de 17 a 19% dos casos de cancro do pâncreas hereditário, especialmente se a mutação ocorrer no gene supressor tumoral *BRCA2* (do inglês, *breast cancer susceptibility 2*), o qual está associado ao processo de carcinogénese<sup>15</sup>.

### 1.1.4. Diagnóstico

O cancro do pâncreas é caracterizado por uma agressividade invulgar e por ser difícil de detetar, resultado de uma propagação metastática precoce, da progressão assintomática da doença e do facto do pâncreas possuir uma localização retroperitoneal. Todas as razões enumeradas levam a que, no momento do diagnóstico, 35% dos doentes se apresentem com PDAC localmente avançado e 45% já apresentem disseminação metastática<sup>13</sup>.

Numa fase inicial a progressão da doença é bastante silenciosa, estando a presença de sintomas intimamente relacionada com um estágio mais avançado da doença. A maior problemática associada ao aparecimento de sintomas, de entre os quais se salientam a dor abdominal, a icterícia, o prurido e a perda de peso, reside no facto dos mesmos serem algo inespecíficos, o que faz com que haja alguma dificuldade em diferenciá-los de outro tipo de doenças<sup>8</sup>.

O diagnóstico é um processo complexo que pode incluir diferentes tipos de ferramentas, quer estas sejam mais gerais, tais como exames físicos e análises sanguíneas, quer sejam mais específicas, tais como exames imagiológicos ou biópsias<sup>16</sup>. Atualmente, o antígeno CA 19-9 é o único biomarcador aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o cancro do pâncreas, sendo este considerado um marcador tumoral, o que significa que é uma substância produzida por um tumor maligno ou por células normais na sua vizinhança. No entanto, este biomarcador é algo inespecífico em estádios iniciais da doença e o facto de existirem valores elevados desta proteína no sangue pode ser indicativo de outras patologias. Assim, este marcador não é usado exclusivamente no diagnóstico do cancro do pâncreas, contudo, pode ser importante na monitorização de um possível tratamento<sup>13,16</sup>.

Relativamente aos exames imagiológicos, a ecografia abdominal é muitas vezes utilizada como ferramenta inicial de diagnóstico. De modo a avaliar as lesões malignas que possam existir no pâncreas, bem como a evolução da doença (envolvimento pelo tumor maligno de alguns vasos sanguíneos e/ou a presença de metástases) pode ser necessário recorrer a imagens de tomografia computadorizada (CT, do inglês *computerized tomography*), de ressonância magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) ou de tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*)<sup>10</sup>.

### 1.1.5. Tratamento

Existem diversos tipos de tratamento para o cancro do pâncreas que dependem exclusivamente do estágio em que o tumor se encontra. Desta forma, a abordagem terapêutica tem de estar em concordância com o estágio do tumor, o que faz com que surja a seguinte classificação, dividida em: ressecável, “*borderline resectable*”, localmente avançado e metastático<sup>17</sup>.

As opções terapêuticas existentes até ao momento são um pouco limitadas, uma vez que o cancro do pâncreas é caracterizado por uma agressividade invulgar e por possuir um certo grau de resistência à quimioterapia e à radioterapia, pelo que se torna de fulcral importância o surgimento de novas terapias, que possam constituir uma alternativa válida às atualmente disponíveis<sup>18</sup>. Para além disso, as opções convencionais não possuem a capacidade de discriminar entre as células normais e as células malignas, o que faz com que tenham um elevado grau de toxicidade associado.

#### 1.1.5.1. Tumor maligno ressecável

A única opção de tratamento potencialmente curativa é a cirurgia, sendo recomendada quando o cancro do pâncreas é considerado ressecável. Esta condição implica que o tumor maligno possa ser totalmente removido através de uma cirurgia, estando, para isso, localizado apenas no pâncreas, ou caso se tenha espalhado para fora dele, não tenha atingido os vasos sanguíneos mais próximos<sup>17,19</sup>. Neste caso podem ser efetuados diferentes tipos de cirurgia dependendo da localização e do tamanho do tumor, nomeadamente se este se localiza na cabeça, corpo ou cauda do pâncreas<sup>17,20</sup>.

Nas circunstâncias atuais, no momento do diagnóstico apenas 15 a 20% dos casos são elegíveis para cirurgia<sup>13</sup>. A opção cirúrgica não significa que o doente fique completamente curado, uma vez que a taxa de recidiva é bastante alta, cerca de 85%<sup>13</sup>. Isto deve-se essencialmente ao facto da ressecção do tumor nem sempre implicar a existência de margens livres, já que o pâncreas é rodeado de estruturas de fulcral sensibilidade e vitalidade, tais como a artéria mesentérica superior e os vasos sanguíneos que permitem a irrigação dos intestinos<sup>13</sup>.

Caso a cirurgia de ressecção seja seguida de quimioterapia, o que se designa por tratamento adjuvante, diminuindo assim a probabilidade de uma recidiva ocorrer, a taxa de sobrevivência a 5 anos pode aumentar substancialmente de 5% para cerca de 30%<sup>13</sup>.

A primeira opção terapêutica adjuvante a ser utilizada deve ser o regime modificado de *FOLFIRINOX* (leucovorina, 5-fluorouracilo, irinotecano e oxaliplatina), caso os doentes possuam um quadro clínico favorável, uma vez que esta combinação de fármacos possui um elevado grau

de toxicidade. Em doentes com mais de 70 anos ou que possuam algum tipo de contraindicação para algum dos fármacos que fazem parte do regime *FOLFIRINOX*, a combinação de gemcitabina e capecitabina pode, também, ser uma alternativa. Nos doentes que estejam num estado mais debilitado é privilegiada a utilização da gemcitabina em monoterapia<sup>21</sup>.

#### **1.1.5.2. “Borderline resectable”**

Neste estágio do cancro do pâncreas, a neoplasia ainda se encontra limitada a este órgão apesar de já poder ter atingido os vasos sanguíneos mais próximos. Ainda assim, pode ser possível que o tumor seja removido através de cirurgia, tendo sido esta precedida de uma terapia neoadjuvante, cuja principal função é a redução do tamanho da massa ou da carga tumoral<sup>22</sup>.

Desta forma, o tratamento indicado é a quimioterapia neoadjuvante, quer através do fármaco gemcitabina ou do regime *FOLFIRINOX*, seguida de um período de quimiorradioterapia e posterior cirurgia. Após este procedimento pode, ainda, ser necessário recorrer a quimioterapia adjuvante, dependendo de cada situação individual<sup>17,20</sup>.

#### **1.1.5.3. Localmente avançado**

Nesta fase da doença, apesar do doente não apresentar doença disseminada para órgãos distantes, não é elegível para cirurgia. A estratégia de tratamento a adotar permanece algo controversa, proporcionando uma baixa sobrevivência global a estes doentes, sendo esta inferior a um ano<sup>17</sup>.

Ainda assim o tratamento padrão recomendado para o cancro do pâncreas localmente avançado é a quimioterapia com gemcitabina num regime de monoterapia durante 6 meses<sup>17</sup>.

#### **1.1.5.4. Metastático**

O estágio metastático do cancro do pâncreas caracteriza-se pela propagação da doença para órgãos distantes, nomeadamente para o fígado, os pulmões, o osso e/ou o cérebro<sup>19</sup>. Nestes casos, mesmo antes da quimioterapia sistémica ser considerada uma opção terapêutica, pode ser necessário ter em conta outras opções cujo principal objetivo será o alívio da sintomatologia dependente da localização das metástases<sup>17</sup>.

Em termos de quimioterapia sistémica podem ser consideradas três opções, consoante o estado em que os doentes se encontrem: a combinação de gemcitabina com nab-paclitaxel, caso a carga tumoral do doente seja muito elevada; o regime *FOLFIRINOX* ou a combinação de gemcitabina com nab-paclitaxel, se a bilirrubinemia do doente for 1,5 vezes inferior ao valor



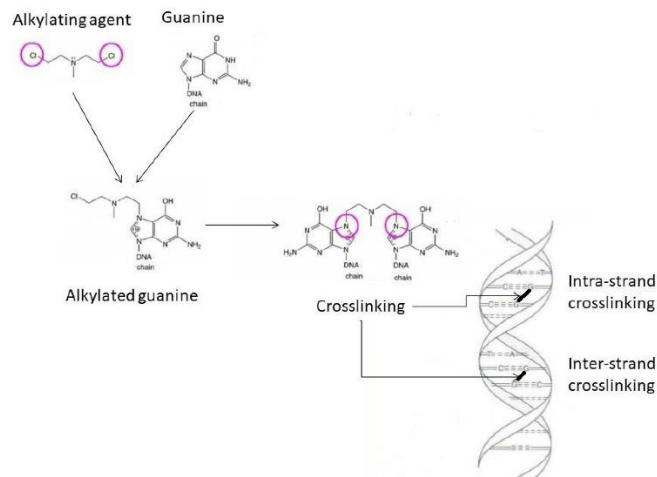
considerado normal; ou gemcitabina em monoterapia, caso a bilirrubinemia do doente seja 1,5 vezes superior ao valor considerado normal<sup>17</sup>. Para além destas opções, em 2019, o olaparib foi aprovado pela FDA para o tratamento do cancro do pâncreas metastático em doentes com mutações no gene *BRCA*, que tenham respondido positivamente a 16 semanas de quimioterapia com derivados da platina<sup>13</sup>.

## 1.2. DNA-damaging agents

Uma das características do cancro é o facto das células tumorais possuírem um elevado nível de instabilidade genómica. Tipicamente, este tipo de células tem mecanismos de reconhecimento da existência de erros no DNA e de reparação dos mesmos. Adicionalmente, são capazes de ignorar os pontos de controlo do ciclo celular, o que se concretiza na sua proliferação descontrolada<sup>23</sup>. Desta forma, as células tumorais são mais suscetíveis a sofrerem ação de compostos que tenham como alvo a indução de mais danos no DNA<sup>24</sup>. A ação destes fármacos pode concretizar-se no bloqueio do ciclo celular ou na indução da morte celular<sup>25</sup>.

Estes agentes quimioterapêuticos podem ser divididos em diferentes classes, consoante o mecanismo de ação subjacente, entre as quais se destacam os agentes alquilantes, os antimetabolitos, os taxanos e os inibidores das topoisomerases<sup>26</sup>.

Os agentes alquilantes são dos compostos mais usados como terapia antineoplásica, de entre os quais se salientam os agentes derivados da platina, nomeadamente a oxaliplatina e a cisplatina<sup>25</sup>. Caracterizam-se por serem eletrofilicos e, por isso, estabelecerem ligações covalentes com grupos funcionais ricos em eletrões nas moléculas alvo, através de substituições nucleofílicas<sup>27</sup>. No que diz respeito ao DNA, os grupos alquilo ligam-se às suas bases nitrogenadas, mais frequentemente à posição N7 dos resíduos de guanina, o que induz ligações cruzadas, quer dentro da mesma cadeia ou entre cadeias complementares (Figura 2)<sup>27,28</sup>. A existência destas ligações cruzadas impossibilita a ligação da RNA polimerase à cadeia de DNA nesse local, o que impede o processo de transcrição e, conseqüentemente, leva ao colapso do garfo de replicação, o que se concretiza na formação de quebras de uma única cadeia (SSB, do inglês *single strand break*) ou quebras da dupla cadeia (DSB, do inglês *double strand break*)<sup>28</sup>.



**Figura 2:** Representação da formação de ligações cruzadas nas cadeias de DNA. Os grupos alquila dos agentes alquilantes ligam-se às bases nitrogenadas, especificamente à posição N7 dos resíduos de guanina, o que forma ligações cruzadas, quer estas sejam dentro da mesma cadeia (“*Intra-strand crosslinking*”) ou entre duas cadeias complementares (“*Inter-strand crosslinking*”). Retirado de <sup>29</sup>.

Os antimetabolitos exercem a sua ação mimetizando moléculas de células normais, uma vez que possuem afinidade para com as enzimas que realizam a síntese dos nucleótidos, bloqueando assim as suas vias metabólicas<sup>23,25</sup>. A incorporação destes compostos faz com que haja um bloqueio das enzimas que permitem a síntese de DNA ou de RNA, pelo que há uma inibição da proliferação celular durante a fase S, já que a célula não tem capacidade para se dividir, o que pode levar à morte<sup>25,26</sup>.

Os taxanos fazem parte da classe de agentes antimicrotubulares, agentes esses que perturbam a progressão mitótica e a dinâmica do citoesqueleto<sup>26</sup>. Os microtúbulos, principais componentes do citoesqueleto das células eucarióticas, estão envolvidos na divisão e na migração celular e por serem estruturas extremamente dinâmicas, alternam entre períodos de crescimento e de encurtamento, o que é importante no movimento dos cromossomas, quer no seu alinhamento durante a metafase ou na separação das cromátidas irmãs durante a anafase<sup>30</sup>. Os taxanos ligam-se aos microtúbulos e estabilizam-nos, o que causa uma inibição da sua ação e organização dinâmica durante as fases da divisão mitótica<sup>30</sup>. Esta ação pode levar ao bloqueio da mitose, à inibição da proliferação celular ou mesmo à morte celular<sup>30</sup>.

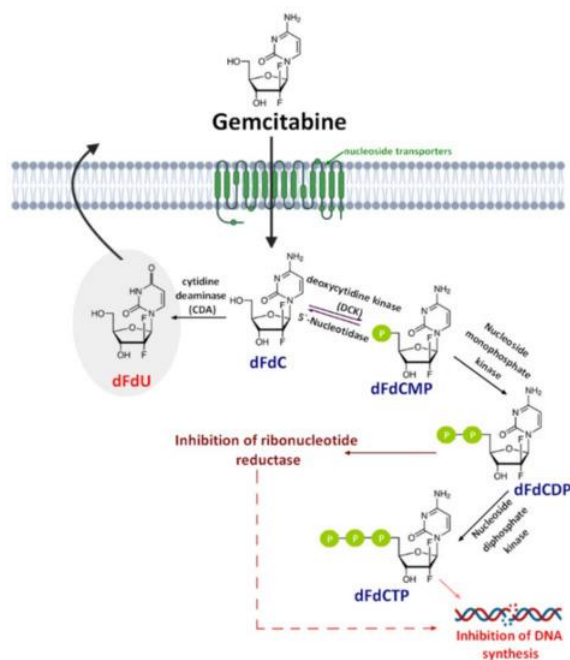
As topoisomerases são enzimas que funcionam de forma a reduzir o grau de torção da cadeia de DNA em dupla hélice<sup>27</sup>. Para que isso se verifique, as topoisomerases I provocam SSB transitórias na cadeia complementar da dupla hélice, de forma a que outra cadeia simples se “desenrole”<sup>23</sup>. Este processo possibilita, no geral, a transcrição do DNA e, de seguida, a reparação das cadeias que possuem quebras<sup>25</sup>. A ação dos inibidores das topoisomerases I concretiza-se na formação de um complexo que contempla a enzima ligada ao DNA, o que faz

com que não possa ocorrer a reparação das SSB transitórias, provocando o bloqueio do progresso do garfo de replicação e a ocorrência de SSB, o que culmina na morte celular<sup>23</sup>.

### 1.2.1. Gemcitabina

A gemcitabina é um composto análogo à desoxicidina, molécula formada pela ligação da citosina à desoxirribose, sendo metabolizada intracelularmente, através da ação das nucleósido-quinases, em nucleósidos difosfato e trifosfato ativos <sup>28,31</sup>. Estes nucleósidos vão, então, ser os promotores da inibição da síntese de DNA, uma vez que impedem o alongamento da cadeia de DNA durante o seu processo de replicação (Figura 3)<sup>28,31</sup>.

Este fármaco que pertence à classe dos antimetabolitos atua, essencialmente, na fase S do ciclo celular, já que é nesta fase que ocorre a replicação do DNA<sup>31</sup>. As células tumorais expostas a este composto denotam um aumento no stress replicativo do DNA, o colapso do garfo de replicação e uma maior dependência dos pontos de controlo do ciclo celular<sup>28</sup>.



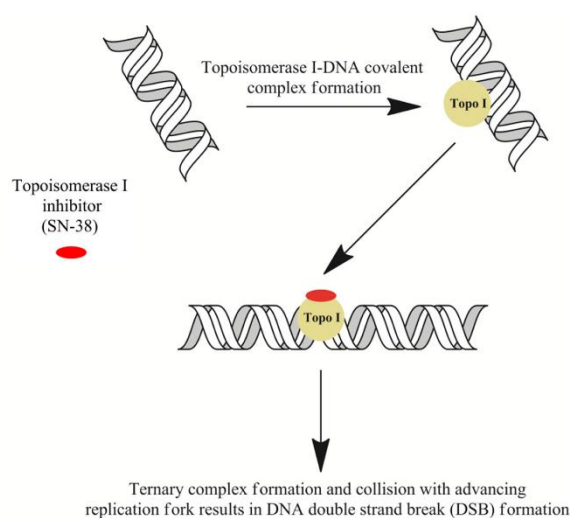
**Figura 3:** Representação do mecanismo de ação da gemcitabina (dFdC), bem como da sua captação celular. Este composto é metabolizado em nucleósidos difosfato (dFdCDP) e trifosfato (dFdCTP) ativos, pela ação das nucleósido-quinases, o que leva à inibição da síntese de DNA. Retirado de <sup>32</sup>.

### 1.2.2. Irinotecano

O irinotecano é um derivado hidrossolúvel semissintético da camptotecina. É um fármaco que, por si só, possui atividade anticancerígena, no entanto, é convertido pela ação de carboxilesterases presentes na maior parte dos tecidos em SN-38, um metabolito cerca de 1000

vezes mais ativo<sup>25</sup>. A sua ação concretiza-se na inibição das topoisomerases I, o que provoca, primeiramente, a formação de SSB (Figura 4)<sup>25,27</sup>. Consequentemente, as SSB dão origem a DSB, durante o processo de replicação, o que se traduz num maior grau de letalidade para as células tumorais durante a fase S do ciclo celular, pelo que o irinotecano pode ser considerado um agente específico desta fase do ciclo celular<sup>25</sup>.

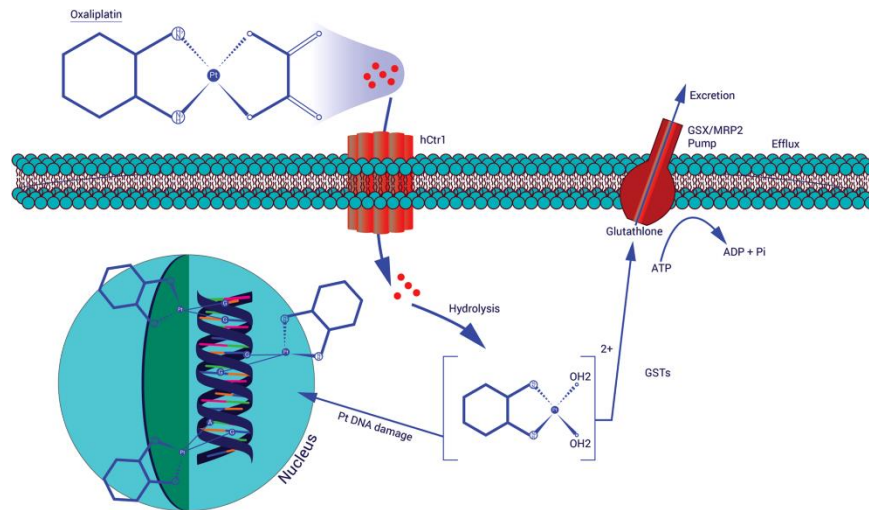
Por ser um inibidor da ação da topoisomerase I, o irinotecano não permite que haja reparação da quebra transitória de cadeia que se forma durante o processo de transcrição do DNA, nomeadamente na fase S do ciclo celular, o que leva ao colapso do garfo de replicação<sup>25</sup>.



**Figura 4:** Representação do mecanismo de ação do SN-38, metabolito ativo do irinotecano, através da inibição da topoisomerase I, o que provoca que as SSB originem DSB, devido ao colapso do garfo de replicação. Adaptado de <sup>33</sup>.

### 1.2.3. Oxaliplatina

A oxaliplatina é um composto derivado da platina, pertencente à classe dos agentes alquilantes, em que o átomo de platina se encontra complexado com o 1,2-diaminociclohexano (DACH) e o grupo oxalato<sup>25</sup>. Após a substituição do grupo oxalato neste complexo, os derivados ativos da oxaliplatina vão formar ligações cruzadas com a cadeia de DNA, quer dentro da mesma cadeia ou até com a cadeia complementar (Figura 5)<sup>25</sup>. Assim, vai ocorrer uma perturbação ao normal funcionamento do processo de transcrição e de síntese do DNA, o que se traduz na morte celular<sup>34</sup>.

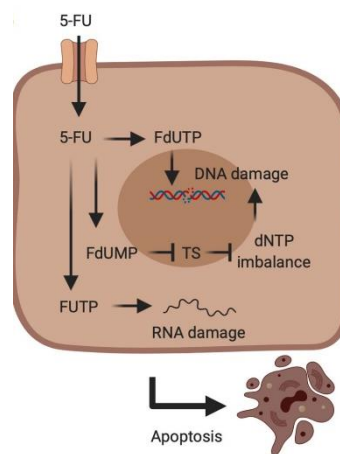


**Figura 5:** Representação do mecanismo de ação da oxaliplatina, que após o seu processo de internalização forma ligações cruzadas com o DNA, o que culmina em morte celular. Retirado de <sup>35</sup>.

### 1.2.4. 5-fluorouracilo

O fluorouracilo é um composto análogo ao uracilo, base nitrogenada exclusiva do RNA, pelo que pertence à classe dos antimetabolitos<sup>36</sup>. O fluorouracilo e o uracilo diferem apenas no elemento que possuem na posição C-5 da sua estrutura de composto orgânico aromático, já que o hidrogênio é substituído pelo flúor<sup>37</sup>.

Este composto é considerado um pró-fármaco, já que tem de ser metabolizado para se tornar ativo, dando origem à fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP)<sup>25</sup>. Este último forma um complexo estável com a enzima timidilato sintetase (TS), o que inibe a desoxitimidina monofosfato (dTMP), nucleótido essencial na replicação e na reparação de erros no DNA (Figura 6)<sup>37</sup>. Para além disso, o 5-fluorouracilo também pode interferir com a síntese de RNA<sup>36</sup>.



**Figura 6:** Representação do mecanismo de ação do 5-fluorouracilo. Por ser um composto análogo ao uracilo é transportado para o interior da célula, onde é metabolizado, dando origem fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), que se liga à enzima timidilato sintetase (TS), inibindo a desoxitimidina monofosfato (dTMP). Isto leva à indução de danos no DNA. Adaptado de <sup>38</sup>.

## 1.3. Inibidores da PARP

### 1.3.1. PARP

A PARP [*poly (ADP-ribose) polymerase*] é uma família de enzimas nucleares que estão envolvidas em diversos processos celulares, tais como a remodelação da cromatina, a reparação do DNA e a apoptose<sup>27</sup>.

Dentro desta família de proteínas existem algumas que se encontram mais bem caracterizadas, nomeadamente a PARP-1 e a PARP-2. Estas duas últimas proteínas catalisam o processo de *PARylation* na presença de uma SSB, sendo este responsável pela modificação de proteínas após o processo de tradução. Assim, as proteínas PARP vão ligar-se à cadeia de DNA no local onde ocorreu a SSB, numa reação que consome  $\text{NAD}^+$ , sintetizando cadeias PAR [*poly (ADP-ribose)*] que são adicionadas a proteínas aceitadoras. O facto das cadeias PAR apresentarem uma carga negativa bastante superior à do DNA, faz com que a repulsão entre cargas iguais origine uma perda de afinidade da PARP para com a molécula de DNA, o que permite o recrutamento de proteínas reparadoras para esse mesmo local. Tudo isto leva a uma remodelação da cromatina, adquirindo uma conformação que facilita a reparação da SSB<sup>39</sup>.

Existem diversos mecanismos de reparação do DNA, sendo que as proteínas PARP possuem um papel fulcral no mecanismo de reparação por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*), que ocorre na presença de SSB causadas por lesões endógenas<sup>18</sup>. Para além disso, as proteínas PARP podem, ainda, estar implicadas, de forma secundária no mecanismo de reparação por recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*), pelo recrutamento de fatores de reparação de DSB; e no mecanismo de reparação por junção de pontas não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*), pela inativação de enzimas quinases dependentes de DNA<sup>18</sup>.

### 1.3.2. Inibidores da PARP

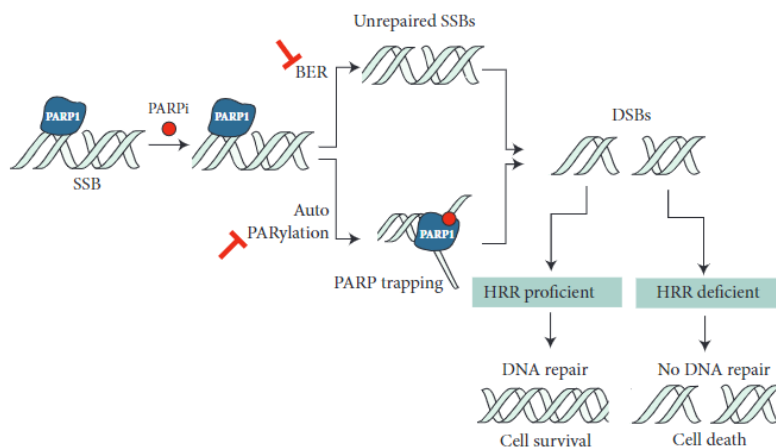
O estudo e a compreensão da família de proteínas anteriormente referida permitiram o surgimento dos inibidores da PARP (iPARP), fármacos antineoplásicos inicialmente aprovados na prática clínica tendo por base o mecanismo da letalidade sintética<sup>39</sup>. Este postula que a perturbação individual de um gene é compatível com a sobrevivência, enquanto que a perturbação simultânea de vários genes resulta em morte celular<sup>40</sup>. Assim, a aprovação inicial destes fármacos só foi feita para tumores com mutações nos genes *BRCA1/2*, uma vez que a

ação dos inibidores da PARP é também responsável, de uma forma indireta, pela acumulação de mutações, nomeadamente de deleções<sup>39,40</sup>.

Os iPARP competem com o NAD<sup>+</sup> pelo local cataliticamente ativo das proteínas PARP, ligando-se às mesmas, o que pode provocar dois efeitos distintos (Figura 7): a inibição catalítica da PARP ou o aprisionamento da PARP no local onde ocorreu a SSB<sup>27,41,42</sup>.

A inibição catalítica das proteínas PARP ao impedir a formação de cadeias PAR, impede a reparação das SSB, uma vez que não permite o recrutamento das proteínas reparadoras<sup>39</sup>. Isto conduz à inibição da via BER, o que inicialmente leva à dificuldade de progressão do garfo de replicação e, conseqüentemente, ao seu colapso e à formação de DSB<sup>39,43</sup>.

O aprisionamento da PARP no local onde ocorreu a SSB é uma consequência da ação dos iPARP, concretizando-se numa via que acarreta um maior grau de citotoxicidade do que a anteriormente descrita<sup>39</sup>. A formação de complexos da PARP ligada ao DNA, consequência da ação dos iPARP, pode resultar do facto de esta não perder a afinidade para com o DNA, devido à inibição da *autoPARylation*, ou da alteração da estrutura alostérica do local de ligação catalítica da PARP, tornando a sua ligação com o DNA mais forte<sup>39,41,43</sup>. A persistência destes complexos da PARP ligada ao DNA provoca stresse replicativo, o que culmina no colapso do garfo de replicação e na conversão de SSB não reparadas em DSB<sup>39,43</sup>.



**Figura 7:** Representação da ação dos iPARP. Estes têm dois efeitos distintos que são a inibição catalítica da PARP, o que impede a reparação das SSB, ou o seu aprisionamento nesse local. Isto leva à conversão de SSB em DSB, o que origina dois cenários: a reparação do DNA, com conseqüente sobrevivência celular, caso a célula possua as vias de reparação por HR funcionais, ou seja, não possua mutações nos genes *BRCA1/2*; ou a incapacidade de reparação de danos no DNA, com conseqüente morte celular, caso a célula não possua as vias de reparação por HR funcionais, o que faz com que tenha de optar pelo mecanismo NHEJ, mais suscetível a erros. Retirado de <sup>41</sup>.

No caso das DSB, existem dois mecanismos de reparação distintos: a reparação por HR (mecanismo preferencial), ou por NHEJ<sup>18</sup>.

A reparação por HR é o mecanismo menos suscetível à ocorrência de erros, no entanto por restaurar a sequência de DNA por complementaridade de bases entre a cromátida irmã, está circunscrito à fase S e G2 do ciclo celular<sup>27</sup>. O complexo MRN, complexo proteico constituído pelas proteínas MRE11, Rad50 e Nbs1, inicia o processo de reparação por HR, aquando da deteção de uma DSB, recrutando e ativando as proteínas quinases ATM e ATR<sup>27</sup>. Estas últimas irão ser responsáveis pela fosforilação de algumas proteínas, entre as quais se salientam a BRCA1, a H2AX e a P53<sup>44</sup>. A proteína BRCA1, por ter uma função de suporte, irá permitir a organização das proteínas reparadoras. Depois disso, o complexo MRE11 provoca a resseção do DNA, de modo a formar uma cadeia simples de DNA não danificada de extremidade 3'<sup>27,44</sup>. A proteína BRCA2 recruta a RAD51, uma proteína do núcleo, sendo que esta vai invadir a cadeia homóloga do DNA, permitindo a síntese de DNA a partir dessa mesma extremidade 3', por complementaridade<sup>27,44</sup>.

O mecanismo de reparação por NHEJ realiza a ligação das extremidades do DNA, na presença de uma DSB, não tendo estas que ser necessariamente homólogas, o que faz com que possa ser empregue durante todas as fases do ciclo celular<sup>27</sup>. Este processo é iniciado pela ligação do heterodímero Ku ao local onde ocorreu a DSB. Este heterodímero origina a formação de um complexo cataliticamente ativo nesse local, uma vez que recruta proteínas quinases dependentes de DNA que aí se ligam<sup>27</sup>. Este fenómeno dá origem à resseção do DNA ou ao preenchimento da lacuna originada por várias enzimas, o que, por fim, culmina na ligação das extremidades não-homólogas<sup>27</sup>.

Algumas células tumorais possuem mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* ou *BRCA2* (Figura 7), pelo que não vai ser viável ocorrer reparação de DSB por HR<sup>18,41</sup>. Por conseguinte, estas células neoplásicas vão ter de recorrer a um processo de reparação alternativo, o NHEJ, que é mais suscetível a erros e resulta facilmente em aberrações cromossómicas e em mutações no DNA mais dificilmente identificáveis. Desta forma, este mecanismo em vez de restaurar a sequência original de DNA, acaba por levar a uma maior fragmentação do genoma e, por fim, à morte celular<sup>18,41</sup>.

O olaparib foi o primeiro iPARP a ser aprovado na prática clínica, estando aprovado para o tratamento de alguns tipos de cancro, especificados na secção 1.3.3. Após a aprovação deste foram, também, aprovados o rucaparib, em 2016, no tratamento de 2º linha (ou superior) do cancro do ovário com mutações *BRCA* associadas; o niraparib, em 2017, como terapia de manutenção no cancro do ovário, após o tratamento com derivados da platina; e o talazoparib, em 2018, como terapia de manutenção de 2º ou 3º linha para o cancro da mama metastático com mutações *BRCA* e sem mutações *HER-2*<sup>41</sup>. Apesar de todos serem iPARP, possuem algumas diferenças, sendo que a principal diz respeito ao poder de aprisionamento da PARP, que se



verifica ser maior no caso do talazoparib, o que faz com que esteja associado a maior eficácia na indução de morte celular<sup>41</sup>.

### 1.3.3. Utilização do olaparib noutros tipos de cancro

O desenvolvimento clínico dos iPARP iniciou-se em 2003, com o intuito de poderem vir a ser usados em combinação com outras opções terapêuticas em tumores malignos sólidos ou como monoterapia em alguns tipos de cancro específicos<sup>27,41</sup>.

Primeiramente, foi estudada a aplicação dos iPARP em cancros com mutações *BRCA1/2* conhecidas, nomeadamente o cancro do ovário e da mama<sup>45</sup>.

No que diz respeito ao cancro do ovário, as mutações referidas estão presentes em cerca de 10 a 15% dos casos, sendo que o olaparib foi aprovado em 2014 como terapia de manutenção. Em 2018, a sua utilização foi alargada para doentes que responderam positivamente a derivados da platina, independentemente do facto de possuírem ou não mutações nos genes *BRCA1/2*<sup>27,45</sup>.

O cancro da mama é também causado por 5 a 10% de alterações genómicas hereditárias, que na sua maioria são mutações *BRCA1/2*. O primeiro iPARP a ser aprovado para o tratamento de cancro da mama metastático *HER-2* negativo com mutações *BRCA* foi o olaparib, uma vez que a sua utilização permitiu o aumento substancial do PFS (do inglês, *progression free survival*, tempo após o tratamento em que cada indivíduo viveu com a doença e o seu estado de saúde não piorou), quando comparado com as opções de quimioterapia padrão, que envolviam o tratamento com uma antraciclina e um taxano<sup>27,46</sup>.

Além dos tipos de cancro referidos, o uso do olaparib foi expandido, por exemplo, para o tratamento do cancro da próstata metastático resistente à castração. Esta aprovação foi feita no caso de os doentes possuírem mecanismos de reparação por HR deficientes, devido à existência de mutações nos genes *BRCA1/2* e *ATM*, que perfazem 19,6% do número total de casos de cancro da próstata<sup>27</sup>.

### 1.3.4. Resistência aos iPARP

De forma semelhante a outras terapias dirigidas, também no caso dos iPARP se tem verificado a aquisição de resistência por parte das células tumorais<sup>39</sup>. As causas para esta resistência podem estar relacionadas com mecanismos passíveis de reestruturarem a via de reparação por HR, uma vez que o mecanismo de ação dos iPARP tem por base a existência de uma deficiência nesta via<sup>41</sup>. Apesar de serem conhecidas algumas das possíveis causas da resistência a este tipo de terapia, esta acaba por ser uma área de difícil compreensão, o que leva

a uma necessidade subjacente de descoberta de estratégias que permitam ultrapassar esta resistência<sup>39</sup>.

A via de reparação por HR pode ser restaurada através da restauração ou reversão da mutação nos genes *BRCA*, da expressão de variantes hipomórficas *BRCA1/2*, de alterações epigenéticas em alguns genes, nomeadamente pela sua desmetilação, o que leva, então, a uma reexpressão proteica e a uma consequente aquisição de resistência por parte das células tumorais, caso algum destes fenómenos ocorra<sup>39,41</sup>.

Adicionalmente, podem ainda existir outros fatores que permitam explicar o fenómeno de resistência a esta classe de fármacos, tais como o decréscimo do nível de PARP, causado pela redução da expressão das mesmas, o que provoca, também, uma diminuição da atividade dos iPARP, a diminuição da concentração intracelular do fármaco, devido ao seu efluxo, que se concretiza num decréscimo do seu efeito e, ainda, a estabilização do garfo de replicação. Neste último caso, há a possibilidade de os erros no DNA serem reparados, pelo que não se verifica a consequência direta da ação dos iPARP<sup>39,41</sup>.

## 1.4. Radioterapia

A descoberta dos raios-X em 1895, por Roentgen, constituiu o ponto inicial para que a radiação ionizante viesse a ser utilizada no tratamento de vários tipos de cancro, caracterizando-se por ser um dos tipos de terapias mais eficazes no tratamento do cancro, e sendo aplicada a cerca de metade dos doentes em algum ponto do seu percurso terapêutico<sup>47,48</sup>.

### 1.4.1. Princípios físicos

A radiação, energia emitida sob a forma de partículas ou ondas, pode ser considerada ionizante, caso tenha a capacidade de remover eletrões aos átomos, ou não ionizante, em caso contrário. A radioterapia recorre ao uso de radiação ionizante, que existe na forma de radiação eletromagnética altamente energética, como é o caso dos raios-X ou gama, ou na forma de partículas, quer estas sejam partículas alfa, partículas beta, eletrões, neutrões ou protões, entre outras<sup>49</sup>. As formas de radiação ionizante mais usadas na prática clínica são os raios-X, os raios gama e os eletrões, estando, também, os protões a serem cada vez mais usados<sup>49</sup>.

Existem cinco mecanismos pelos quais a radiação eletromagnética altamente energética, no caso os raios-X, podem interagir com a matéria, que são o efeito fotoelétrico, o efeito de *Compton*, o efeito de *Rayleigh*, a produção de pares e as reações fotonucleares. Nos três

primeiros casos considerados a radiação interage com os elétrons orbitais, enquanto que nos dois últimos interage diretamente com o núcleo<sup>48</sup>.

No efeito fotoelétrico, o elétron, de camadas mais internas e por isso mais fortemente ligado ao núcleo, absorve totalmente a energia do fóton incidente, o que faz com que este seja ejetado para fora do átomo. Esta é a interação dominante para baixas energias, entre 10 e 26 keV, sendo a mais importante em imagiologia de diagnóstico<sup>48,50</sup>.

No caso do efeito de *Compton*, dá-se uma colisão entre um fóton e um elétron de uma camada orbital mais externa do átomo, mas apenas uma parte da energia é transmitida ao elétron, o que resulta num desvio na direção da trajetória tanto do fóton como do elétron. O efeito de Compton é a interação dominante para fótons com energias entre os 26 keV e os 24 MeV, pelo que se recorre ao seu uso para atingir alvos localizados mais profundamente no corpo humano<sup>48,50</sup>.

No efeito de *Rayleigh* ocorre uma interação entre o fóton e um elétron de uma camada periférica, existindo conseqüentemente uma absorção e reemissão do fóton, apenas com alteração da sua direção e sem transmissão de energia para o meio. Por este motivo, este tipo de interação não contribui para a dose absorvida, apresentando reduzida relevância no contexto da radioterapia<sup>48</sup>.

A produção de pares sucede quando o fóton incidente, com uma energia superior a 1,022 MeV, se aproxima do núcleo de átomos, ficando sujeito ao campo elétrico nuclear. O resultado desta interação entre o fóton e o núcleo é a produção de um par de partículas, um elétron e um pósitron<sup>48</sup>.

As reações fotonucleares caracterizam-se pela incidência de fótons altamente energéticos (de 8 a 16 MeV) no núcleo atômico, o que leva à emissão de partículas nucleares, nomeadamente de prótons ou de neutrões. Os neutrões possuem maior eficiência biológica relativa quando comparados com os raios-X<sup>48,50</sup>. Isto resulta num maior risco de desenvolvimento de cancro devido à exposição de radiação com neutrões, em tecidos sensíveis, e na necessidade de existência de materiais de blindagem com maior espessura nas salas de tratamento de radioterapia<sup>48,50</sup>.

É importante salientar que a dose absorvida é o parâmetro que melhor se correlaciona com os efeitos biológicos da radiação ionizante, podendo ser definida como a quantidade de energia cedida por unidade de massa do tecido, sendo que a sua unidade do SI é o Gray (Gy), que é equivalente a 1 J/Kg<sup>48,50</sup>.

### 1.4.2. Radioterapia externa

O tratamento de doenças oncológicas com utilização de radiação ionizante pode ser feito através de radioterapia de fonte externa, de radioterapia de fonte interna, designada de forma comum por braquiterapia, e de terapia com radionuclídeos<sup>51</sup>. A radioterapia de fonte externa, como o próprio nome indica, recorre a uma fonte de radiação externa ao doente, nomeadamente raios-X ou eletrões altamente energéticos<sup>51</sup>. No caso da braquiterapia, o material radioativo é inserido dentro ou próximo do órgão a ser tratado, o que faz com que haja uma menor probabilidade em danificar células normais, sendo um dos tratamentos padrão do cancro da próstata<sup>47,48</sup>. A terapia com radionuclídeos pressupõe a administração de radiofármacos, que são então constituídos, a maior parte das vezes, por radionuclídeos (principalmente emissora alfa ou beta) incorporados em moléculas específicas. Após a sua administração, os radiofármacos dirigem-se para o local onde se encontram as células tumorais, emitindo radiação capaz de as destruir, de acordo com as características de cada radiofármaco<sup>51</sup>.

Os raios-X altamente energéticos usados de uma forma mais comum em radioterapia de fonte externa são produzidos por aceleradores lineares. Estas estruturas usam micro-ondas (radiação eletromagnética de baixa energia) para acelerar eletrões, que são de seguida utilizados para bombardear alvos específicos e permitir a produção de raios-X altamente energéticos<sup>48</sup>.

Existem diversos tipos de aceleradores lineares, sendo que a maioria dos tratamentos é realizada em aceleradores lineares de braço em C, como o que se encontra representado na Figura 8.



**Figura 8:** Representação do sistema de radioterapia TrueBeam®. Retirado de <sup>52</sup>.

Neste equipamento, as micro-ondas aceleram os eletrões horizontalmente, enquanto o feixe de raios-X, responsável pela irradiação, é extraído perpendicularmente. Estes dois sistemas

encontram-se contidos na *gantry*, estrutura essa que roda 360° em torno do doente, o que permite a irradiação numa qualquer posição angular<sup>48</sup>. Para além disso, os aceleradores lineares possuem colimadores e filtros que permitem a modelação do feixe, até mesmo durante a aplicação do tratamento. Como exemplo, o MLC (do inglês, *multi-leaf collimator*) ao modelar a forma e intensidade do feixe, possibilita uma irradiação mais direcionada aos tecidos alvo, minimizando a exposição dos tecidos normais<sup>48</sup>.

### 1.4.3. Efeitos biológicos

A radioterapia baseia-se na indução de efeitos citotóxicos pela radiação ionizante no DNA e noutras macromoléculas de células tumorais, efeitos esses que conjugados com a instabilidade genómica e com a existência de vias de reparação de danos no DNA defeituosas, se concretizam no aparecimento de danos irreversíveis, o que culmina em morte celular<sup>42</sup>. Estes efeitos distinguem-se em efeitos diretos ou efeitos indiretos. Os efeitos diretos manifestam-se, principalmente, na quebra de ligações nas cadeias do DNA ou na ionização dos átomos que as constituem, sendo que estes também podem ocorrer noutras macromoléculas, como é o caso dos lípidos e das proteínas<sup>53</sup>. Em contrapartida, os efeitos indiretos são mediados pelo processo de radiólise da água, isto é, a interação da radiação causa a ionização das moléculas de água, o que leva à formação de radicais livres, que vão ser responsáveis por provocar danos no DNA ou outras biomoléculas<sup>53</sup>. Na molécula de DNA, a radiação ionizante provoca DSB e SSB, o que leva à ativação de mecanismos de reparação do DNA.

A radiação ionizante atua de forma mais eficaz nas células tumorais que se encontram em divisão, podendo ser feita uma relação entre as fases do ciclo celular e a sensibilidade aos efeitos da radiação<sup>49</sup>. A fase S é associada a maior radiorresistência, pela maquinaria disponível nesta fase para a síntese e reparação de DNA, nomeadamente enzimas de reparação<sup>54</sup>. Pelo contrário, as fases mais radiosensíveis são o final da fase G2 e a fase M, uma vez que, neste espaço temporal, as células se encontram a iniciar o processo de divisão mitótica, pelo que não têm os mecanismos necessários para realizar uma reparação de danos adequada, antes de ocorrer a segregação dos cromossomas<sup>54</sup>. Adicionalmente, existem vários *checkpoints* durante a fase G2 que impedem as células danificadas de iniciarem o processo de divisão mitótica<sup>55</sup>.

A radioterapia pode ser responsável pela morte de células tumorais por diversas vias, tais como a apoptose, a necrose, a senescência e a autofagia, não sendo este um tipo de tratamento com efeitos imediatos<sup>56</sup>. A apoptose é um desses tipos de morte celular, em que existe um encolhimento da célula, com conseqüente condensação da cromatina, e a formação de corpos apoptóticos, o que permite que a membrana plasmática permaneça intacta durante o

processo<sup>50,56</sup>. Para além do mecanismo referido, as células tumorais podem morrer como consequência da catástrofe mitótica, processo no qual as células perdem a capacidade de realizar a citocinese, o que é causado pelas múltiplas aberrações no DNA, levando à formação de células multinucleadas e, conseqüentemente, à morte por sobrecarga de danos, podendo esta ocorrer por apoptose, necrose ou outro tipo de morte celular<sup>50,56</sup>.

Adicionalmente, pode ainda ocorrer morte celular por necrose, que se concretiza numa forma desregulada de morte, na qual as células sofrem alterações morfológicas drásticas, como uma forma nuclear atípica com vacúolos, condensação da cromatina, rutura da membrana plasmática, com conseqüente extravasamento do citoplasma, entre outras<sup>56,57</sup>. A necrose é desencadeada por condições desfavoráveis resultantes da irradiação, tais como alterações extremas no pH e desequilíbrio iónico tanto no interior das células como no ambiente extracelular<sup>57</sup>.

A senescência pode ser descrita como um bloqueio permanente do ciclo celular, em que as células tumorais perdem a capacidade de divisão, apesar de permanecerem viáveis e metabolicamente ativas<sup>57</sup>. Ao perderem a capacidade de divisão, perdem também a capacidade de sintetizar DNA, o que significa que as mesmas deixarão de proliferar<sup>57</sup>.

Para além dos tipos de morte celular já referidos, salienta-se, ainda, a autofagia, na qual ocorre a fusão de organelos citoplasmáticos danificados com lisossomas, formando-se os autofagossomas, local onde irá ocorrer a digestão de todo o seu conteúdo<sup>56,57</sup>.

### 1.5. Objetivos

O cancro do pâncreas é fundamentalmente caracterizado por ser de difícil deteção e possuir uma disseminação metastática bastante precoce, o que confere ao doente com cancro do pâncreas uma sobrevida muito baixa. As opções terapêuticas potencialmente curativas restringem-se à cirurgia, que só pode ser realizada numa fase muito inicial da doença em que o tumor é considerado ressecável. Para além desta, as restantes opções existentes são utilizadas maioritariamente como terapias paliativas, pelo que se torna evidente a necessidade de serem descobertas novas e eficazes abordagens de tratamento.

Atualmente, o olaparib apenas se encontra aprovado para o tratamento do cancro do pâncreas metastático em doentes com mutações no gene *BRCA*, que tenham respondido positivamente a 16 semanas de quimioterapia com derivados da platina<sup>13</sup>.

O principal objetivo do nosso trabalho é otimizar a atividade antitumoral do inibidor da PARP olaparib, independentemente do estado da mutação *BRCA1/2*, através da sua combinação com *DNA-damaging agents* (gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina ou 5-fluorouracilo) ou

radioterapia de fonte externa, quer num regime simultâneo quer num regime sequencial, de forma a aferir se alguma das combinações possui um efeito sinérgico. O racional do uso de DNA-DA e de radioterapia assenta no facto de ambos induzirem uma sobrecarga de erros no DNA, que não vão poder ser reparados devido à ação do iPARP. Em suma, o nosso trabalho pretende avaliar até que ponto a combinação de terapêuticas já usadas no tratamento do cancro do pâncreas pode aumentar a eficácia da abordagem terapêutica e poder vir a ser efetivamente usada como primeira linha de tratamento, na prática clínica.





## **2. Materiais e Métodos**



Neste capítulo serão abordados os vários procedimentos, materiais e técnicas utilizados no desenvolvimento deste projeto.

Primeiramente, foram estudados os efeitos dos DNA-*damaging agents* (DNA-DA), do inibidor da PARP e da radioterapia em células de adenocarcinoma pancreático num regime de monoterapia, com o intuito de estabelecer raciais para a sua conseqüente combinação.

Numa segunda fase, o intuito do projeto consistiu na associação do inibidor da PARP com cada DNA-DA, em combinações tanto simultâneas como sequenciais, e também com a radioterapia, com a finalidade de avaliar o seu possível efeito sinérgico.

## 2.1. Cultura celular

A cultura celular compreende um conjunto de técnicas laboratoriais que permitem o crescimento de células em condições fisiológicas, fora do organismo original, com a finalidade de serem criados modelos que estudem mecanismos de biologia celular e de doenças, bem como o grau de toxicidade de novos fármacos<sup>58</sup>. As condições de cultura variam consoante o tipo de linha celular. No geral necessitam de um meio de cultura, que forneça os nutrientes essenciais ao crescimento celular, fatores de crescimento, hormonas e um ambiente físico-químico regulado<sup>59</sup>.

Na realização deste trabalho foi usada a linha celular MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™), representativa de cancro do pâncreas, adquirida à *American Type Collection Culture* (ATCC). Esta linha celular foi isolada de um tecido tumoral, mais concretamente um adenocarcinoma que envolvia o corpo e cauda do pâncreas, de um homem com 65 anos<sup>60</sup>. É importante salientar que as células MIA PaCa-2 apresentam uma morfologia do tipo epitelial aderente com células arredondadas e possuem mutações nos genes *TP53* e *KRAS*, o que lhes confere a capacidade de crescerem descontroladamente, mesmo na presença de danos, aspeto característico de células tumorais<sup>61,62</sup>. Para além destas células maioritárias a linha celular apresenta uma subpopulação de células semi-aderentes, com as mesmas características.<sup>61,62</sup>

A linha celular MIA PaCa-2 foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648) suplementado com 1% de antibiótico (Sigma, A5955) e 0,25 mM de piruvato de sódio (Sigma, S8636) e enriquecido com 5% de soro de bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Gibco, A5256701). A linha celular foi mantida em condições ótimas de crescimento celular, nomeadamente à temperatura de 37°C e numa atmosfera humificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Uma vez que esta linha celular cresce em monocamada aderente, foi necessário destacá-la da base do frasco de cultura para proceder à realização dos ensaios *in vitro*. Para tal, recorreu-

se a um agente para desagregação enzimática, uma solução de tripsina-EDTA (Sigma, T4049). Uma exposição prolongada à solução de dissociação pode contribuir para uma redução da viabilidade celular, pelo que este procedimento foi estritamente controlado.

As células, cuja avaliação foi feita através da monitorização frequente dos frascos de cultura no microscópio ótico invertido (Motic AE31), foram destacadas para subcultura quando atingida entre 80 a 90% de confluência. Para a subcultura, procedeu-se à remoção do meio de cultura com a consequente lavagem do frasco com uma solução tampão fosfato-salina com pH a 7,4 (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*), de forma a eliminar a totalidade do meio de cultura. De seguida, removeu-se o PBS e adicionaram-se 2 mL da solução de tripsina-EDTA (para um frasco com 75 cm<sup>2</sup> de área) e incubou-se a suspensão durante cerca de 5 minutos. Após esse período, verificou-se o destacamento das células, através da observação ao microscópio ótico invertido, e procedeu-se à inativação da tripsina com, pelo menos, 5 mL de meio de cultura suplementado com 5% de FBS, homogeneizando-se bem a solução, para evitar a formação de agregados celulares.

Após este processo, determinou-se a concentração celular da suspensão. O método de exclusão do azul de tripano foi utilizado com essa finalidade, uma vez que permite aferir o número de células viáveis e não viáveis de uma suspensão celular. Após a adição do azul de tripano a uma amostra da suspensão numa razão de 1:1 procedeu-se à contagem celular, com recurso a uma câmara de *Neubauer* e ao microscópio ótico invertido, com uma ampliação total de 100 vezes, e posterior determinação da concentração celular.

## 2.2. Fármacos

Como já foi referido, a cultura celular é amplamente utilizada para avaliar o grau de toxicidade de novos fármacos. Nesse sentido, durante o nosso trabalho foi avaliado, primeiramente e de forma isolada, o grau de citotoxicidade dos agentes quimioterapêuticos e do inibidor da PARP, que já se encontram aprovados para o tratamento do cancro do pâncreas, de forma a ser estabelecido um racional de base para a sua combinação, quer simultânea quer sequencial.

Os DNA-DA utilizados foram a gemcitabina (*Gemcitabina Aurovitas*, 40 mg/mL), o irinotecano (*Irinotecano Accord*, 20 mg/mL), a oxaliplatina (*Oxaliplatina Kabi*, 5 mg/mL) e o 5-fluorouracilo (*Fluorouracilo Hikma*, 50 mg/mL), gentilmente cedidos pelo Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), ao abrigo de um protocolo de cedência de fármacos existente entre o CHUC e a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. O inibidor da PARP empregue foi o olaparib (Thermo Scientific, 466292500), que foi reconstituído em dimetilsulfóxido (DMSO) na

concentração de 44 mg/mL. Todos os fármacos foram mantidos em conformidade com as suas condições ideais de armazenamento, tendo em conta a sua estabilidade. Todas as diluições necessárias foram preparadas imediatamente antes da adição dos fármacos às culturas celulares.

Para todos os tipos de tratamento, as células foram semeadas com uma densidade de 10 000 células por poço, em placas de 96 poços. Após uma incubação durante 24 horas, intervalo de tempo suficiente para promover a adesão das células ao fundo do poço, procedeu-se à adição dos fármacos.

### **2.2.1. Tratamento com os fármacos em regime de monoterapia**

Inicialmente, procedeu-se à administração dos fármacos num regime de monoterapia, de forma a avaliar os efeitos citotóxicos de cada um em separado. Com essa finalidade, foi escolhido um intervalo de concentrações para cada fármaco, resultado de um processo de otimização que teve por base concentrações utilizadas na literatura, para outras linhas celulares, e os seus efeitos foram avaliados para três tempos de incubação distintos: 24, 48 e 72 horas.

Em cada ensaio, foram consideradas duas condições controlo, ambas com células e sem tratamento: uma com apenas meio de cultura e outra de controlo com veículo. Neste último controlo foi adicionado o solvente usado na dissolução de cada fármaco, isto é, DMSO no caso do olaparib e uma solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) nos restantes fármacos. O facto de existir um controlo com veículo em cada ensaio permite aferir se os efeitos observados se devem efetivamente à ação dos fármacos ou se o solvente tem efeito citotóxico, por si só.

As concentrações de cada fármaco para cada intervalo de tempo considerado encontram-se apresentadas na Tabela 1.

A avaliação do efeito do tratamento com cada fármaco num regime de monoterapia permitiu a determinação da concentração inibitória média,  $IC_{50}$  (do inglês, *half-maximal inhibitory concentration*) (secção 2.2.5), através da avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB (do inglês, *sulforhodamine B*) (secção 2.2.4), o que serviu de base para o estabelecimento das concentrações usadas nos regimes de combinações de fármacos, tanto simultâneas (secção 2.2.2) como sequenciais (secção 2.2.3).

**Tabela 1:** Concentrações utilizadas para o tratamento com cada fármaco, num regime de monoterapia.

	24h	48h	72h
[Olaparib] (µM)	[15,625 – 2000]	[15,625 – 2000]	[15,625 – 2000]
[Gemcitabina] (µM)	[468,750 – 30000]	[7,324 – 30000]	[5,588 × 10 <sup>-5</sup> – 7,324]
[Irinotecano] (µM)	[0,015 – 2000]	[0,015 – 2000]	[0,015 – 2000]
[Oxaliplatina] (µM)	[0,977 – 500]	[0,488 – 500]	[0,007 – 500]
[5-Fluorouracilo] (µM)	[78,125 – 160000]	[1,221 – 160000]	[0,305 – 40000]

### 2.2.2. Combinações simultâneas

O regime de combinações pressupôs sempre a utilização do olaparib com um dos fármacos de quimioterapia convencional, de forma a avaliar o efeito deste tipo de regime de administração, comparativamente à administração isolada de cada um dos fármacos (secção 2.2.5).

O tratamento com cada fármaco isoladamente possibilitou o estabelecimento de uma razão entre o IC<sub>50</sub> de cada DNA-DA e o IC<sub>50</sub> do olaparib, para cada intervalo de tempo considerado. Este racional foi, então, empregue para calcular a concentração de cada um dos agentes de quimioterapia, de forma a combinar os fármacos simultaneamente a uma proporção constante, dada pela razão entre os valores de IC<sub>50</sub> já referidos.

As combinações simultâneas implicaram a administração dos fármacos num regime de concomitância. As concentrações de cada fármaco para cada tempo (24, 48 e 72h) considerado encontram-se apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Concentrações de cada fármaco utilizadas no regime de combinações simultâneas.

	24h	48h	72h
[Olaparib] (µM)	[7,81 – 1000]		
[Gemcitabina] (µM)	[335,35 – 42925,40]	[204,20 – 26137,05]	[6,34 – 811,71] × 10 <sup>-5</sup>
[Irinotecano] (µM)	[3,81 – 486,36]	[1,23 – 157,63]	[0,21 – 27,15]
[Oxaliplatina] (µM)	[1,09 – 139,26]	[0,89 – 114,50]	[0,15 – 19,43]
[5-Fluorouracilo] (µM)	[1134,63 – 145233,27]	[13,93 – 1783,24]	[0,89 – 114,45]

Decorridos os tempos considerados, foi avaliado o conteúdo proteico pelo ensaio de SRB (secção 2.2.4).

### 2.2.3. Combinações sequenciais

Para além das combinações simultâneas foram também testadas combinações sequenciais, em que o olaparib foi administrado 24h antes ou 24h depois dos DNA-DA. Neste caso, a avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB (secção 2.2.4) foi realizada 48h e 72h depois da adição do primeiro fármaco e, conseqüentemente, 24h e 48h depois da adição do segundo.

Considerando o conjunto de combinações em que o olaparib foi administrado 24h antes dos restantes agentes de quimioterapia, foi tido em consideração o seu  $IC_{50}$  às 48h e às 72h, enquanto que para os restantes fármacos se considerou o seu  $IC_{50}$  às 24h e às 48h, uma vez que estes são os intervalos de tempo em que os fármacos estiveram efetivamente em contacto com as células. Os valores de  $IC_{50}$  descritos foram, então, utilizados para determinar, mais uma vez, o intervalo de concentrações para a gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina e 5-fluorouracilo, que se encontram apresentados na Tabela 3, mantendo-se, mais uma vez, uma proporção constante na combinação.

**Tabela 3:** Concentrações usadas para o regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h antes dos restantes fármacos.

	<b>Olaparib 48h DNA-DA 24h</b>	<b>Olaparib 72h DNA-DA 48h</b>
<b>[Olaparib] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	[7,81 – 1000]	
<b>[Gemcitabina] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	[406,22 – 51995,63]	[172,38 – 22064,99]
<b>[Irinotecano] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	[4,60 – 589,13]	[1,04 – 133,07]
<b>[Oxaliplatina] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	[1,32 – 168,69]	[0,76 – 96,66]
<b>[5-Fluorouracilo] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	[1374,39 – 175921,38]	[11,76 – 1505,42]

No caso em que o olaparib foi adicionado 24h depois dos outros agentes, utilizou-se o seu  $IC_{50}$  para as 24h e 48h e o  $IC_{50}$  dos restantes fármacos para as 48h e 72h, para calcular as respetivas concentrações destes últimos, as quais se encontram apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Concentrações usadas para o regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h depois dos restantes fármacos.

	DNA-DA 48h Olaparib 24h	DNA-DA 72h Olaparib 48h
[Olaparib] ( $\mu\text{M}$ )	[7,81 – 1000]	
[Gemcitabina] ( $\mu\text{M}$ )	[168,58 – 21577,64]	$[7,50 – 961,50] \times 10^{-5}$
[Irinotecano] ( $\mu\text{M}$ )	[1,02 – 130,13]	[0,25 – 32,16]
[Oxaliplatina] ( $\mu\text{M}$ )	[0,74 – 94,52]	[0,18 – 23,01]
[5-Fluorouracilo] ( $\mu\text{M}$ )	[11,50 – 1472,17]	[1,06 – 135,57]

#### 2.2.4. Avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB

O ensaio de SRB é umas das técnicas mais empregues para testar a citotoxicidade de compostos. Este ensaio baseia-se na capacidade do corante SRB, um corante rosa carregado negativamente, se ligar, em ambiente ácido, aos aminoácidos básicos presentes nas proteínas das células<sup>63</sup>. Quanto maior for a quantidade de corante que se ligou aos aminoácidos, maior será o conteúdo proteico celular, o que poderá servir como medida indireta da proliferação celular<sup>63</sup>.

As vantagens desta técnica comparativamente a outros ensaios colorimétricos assentam no facto de possuir uma elevada taxa de reprodutibilidade e sensibilidade, um baixo custo, um *endpoint* estável e não interferir com reações de oxidação-redução<sup>63,64</sup>.

Após os tempos considerados e já referidos, as placas foram retiradas da incubadora, descartando-se o meio de cultura. Depois disso, as células foram fixadas através da adição, a cada poço, de 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de metanol com 1% de ácido acético, e depois deixadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante a noite. Seguidamente, descartou-se a solução e as placas foram deixadas a secar. Adicionaram-se, de seguida, 75  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de SRB a 0,05% (Sigma, S9012), que ficou a incubar durante, pelo menos, 45 minutos, para que o corante se pudesse ligar aos aminoácidos presentes nas células. Decorrido esse tempo, todos os poços da placa foram lavados cuidadosamente com uma solução aquosa de ácido acético a 1%, pelo menos três vezes, de forma a eliminar apenas o corante não ligado, e foram deixadas a secar. Por fim, o corante ligado aos aminoácidos foi dissolvido através da adição de 100  $\mu\text{L}$ /poço de Tris-NaOH (10 mM, pH 10), uma base forte, já que a ligação do corante aos aminoácidos só se quebra em meio básico. As absorvâncias foram quantificadas num espectrofotómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®) com um comprimento de onda de 540 nm e com um filtro de referência de 690 nm.



### 2.2.5. Análise estatística

Com a finalidade de proceder à análise estatística dos resultados recorreu-se ao programa *GraphPad Prism*, versão 9.4.0 para *Windows* (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Primeiramente, analisaram-se os resultados do ensaio de SRB, após o tratamento com gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina, 5-fluorouracilo e olaparib num regime de monoterapia. Os valores do conteúdo proteico foram normalizados aos do controlo com veículo, para que posteriormente fosse possível traçar a curva de dose-resposta. Com essa finalidade, ajustaram-se os dados a uma regressão não linear, de forma a obter um gráfico que representava o conteúdo proteico em função do  $\log_{10}$  da concentração do iPARP ou dos DNA-DA, com um declive variável, modelo este que devolveu o valor do  $IC_{50}$  para cada caso considerado.

As combinações de olaparib com os diversos agentes de quimioterapia foram avaliadas através do cálculo do índice de combinação (CI, do inglês *combination index*), estabelecido a partir do estudo dos efeitos da combinação de fármacos por parte de *Chou e Talalay*<sup>65</sup>. Este método baseia-se na lei da ação de massas, pelo que estabelece uma teoria que prevê a ligação entre uma entidade única e múltiplas entidades, como é o caso dos fármacos num regime de monoterapia e em combinação, respetivamente<sup>66</sup>. O CI de uma combinação entre dois fármacos (fármaco 1 e fármaco 2, por exemplo) foi, então, calculado de acordo com a Equação 1. Para além disso, os valores de  $IC_{50}$  de todos os fármacos na combinação foram comparados com os obtidos no regime de monoterapia, tendo as diminuições estatisticamente significativas sido comprovadas pela não interseção dos respetivos intervalos de confiança a 95%.

$$CI = \frac{IC_{50}(\text{fármaco 1 na combinação})}{IC_{50}(\text{fármaco 1 em monoterapia})} + \frac{IC_{50}(\text{fármaco 2 na combinação})}{IC_{50}(\text{fármaco 2 em monoterapia})}$$

**Equação 1:** Fórmula para o cálculo do índice de combinação de acordo com método de *Chou-Talalay*.

De uma forma simples, o método de *Chou-Talalay* indica que caso se obtenha um CI menor do que 1 estamos perante um efeito sinérgico, caso o CI seja igual a 1 trata-se de um efeito aditivo e se o CI for superior a 1 o efeito da combinação será antagónico<sup>65</sup>. Uma vez que podem existir valores bastantes diferentes de CI com a mesma classificação de efeito, tornou-se necessário dividir estas categorias mais abrangentes em categorizações mais específicas que se encontram apresentadas na Tabela 5<sup>66</sup>.

**Tabela 5:** Categorização dos efeitos obtidos para uma combinação, de acordo com o CI obtido. Adaptado de<sup>67</sup>.

CI	Descrição do Efeito
<0,1	Sinergia muito forte
0,1 – 0,3	Fortemente sinérgico
0,3 – 0,7	Sinérgico
0,7 – 0,85	Moderadamente sinérgico
0,85 – 0,90	Ligeiramente sinérgico
0,90 – 1,10	Praticamente aditivo
1,10 – 1,20	Ligeiramente antagónico
1,20 – 1,45	Moderadamente antagónico
1,45 – 3,30	Antagónico
3,3 – 10	Fortemente antagónico
>10	Antagonismo muito forte

Para além deste parâmetro calculou-se, também, o índice de redução de dose (DRI, do inglês *dose reduction index*), que indica o número de vezes que a concentração individual de cada fármaco pode ser reduzida na combinação, devido às interações de sinergia, comparativamente às concentrações de cada fármaco que seriam utilizadas isoladamente<sup>67</sup>. Este parâmetro teve e através do cálculo apresentado na Equação 2

$$DRI = \frac{IC_{50}(\text{fármaco em monoterapia})}{IC_{50}(\text{fármaco na combinação})}$$

**Equação 2:** Fórmula para o cálculo do índice de redução de dose (DRI) de acordo com o método de *Chou-Talalay*.

De forma a comparar os valores de CI e DRI para todas as combinações apresentadas e determinar se possuem diferenças estatisticamente significativas entre si, calcularam-se os intervalos de confiança a 95% para todos estes valores. Primeiramente, extraiu-se o valor da incerteza associada a cada valor de  $IC_{50}$  ( $\delta$ ), a partir dos intervalos de confiança obtidos no programa *GraphPad Prism*. Por definição, um intervalo de confiança a 95% supõe que existe uma probabilidade de 95% de o valor do  $IC_{50}$  real estar contido no intervalo considerado. Por conseguinte, os extremos deste intervalo resultam da subtração e soma de 1,96 vezes o valor da incerteza ao valor médio obtido para o  $IC_{50}$  (mais uma vez obtido diretamente no *GraphPad Prism*).

Depois da determinação de todas as incertezas para cada  $IC_{50}$  envolvido no cálculo do CI e DRI, determinaram-se as incertezas associadas a estes valores, através da propagação de erros.

As fórmulas utilizadas para o cálculo das incertezas associadas ao CI e DRI encontram-se apresentadas na Equação 3 e Equação 4.

$$\delta_{CI} = \sqrt{\left(\frac{d CI}{d IC_{50}(c)} \cdot \delta IC_{50}(c)\right)^2 + \left(\frac{d CI}{d IC_{50}(m)} \cdot \delta IC_{50}(m)\right)^2} =$$

$$= \sqrt{\left(\frac{1}{IC_{50}(m_1)} \cdot \delta IC_{50}(c_1)\right)^2 + \left(\frac{1}{IC_{50}(m_2)} \cdot \delta IC_{50}(c_2)\right)^2 + \left(-\frac{IC_{50}(c_1)}{IC_{50}(m_1)^2} \cdot \delta IC_{50}(m_1)\right)^2 + \left(-\frac{IC_{50}(c_2)}{IC_{50}(m_2)^2} \cdot \delta IC_{50}(m_2)\right)^2}$$

**Equação 3:** Fórmula para o cálculo da incerteza associada ao CI para cada combinação, onde a letra **c** representa a combinação, a letra **m** representa o regime de monoterapia e **1** e **2** representam os 2 fármacos que constituem a combinação.

$$\delta_{DRI} = \sqrt{\left(\frac{d DRI}{d IC_{50}(m)} \cdot \delta IC_{50}(m)\right)^2 + \left(\frac{d DRI}{d IC_{50}(c)} \cdot \delta IC_{50}(c)\right)^2} =$$

$$= \sqrt{\left(\frac{1}{IC_{50}(c)} \cdot \delta IC_{50}(m)\right)^2 + \left(-\frac{IC_{50}(m)}{IC_{50}(c)^2} \cdot \delta IC_{50}(c)\right)^2}$$

**Equação 4:** Fórmula para o cálculo da incerteza associada ao DRI para cada fármaco na combinação, onde a letra **c** representa a combinação e a letra **m** representa o regime de monoterapia.

Após o cálculo das incertezas associadas a cada valor de CI e de DRI, é apenas necessário subtrair e somar 1,96 vezes o valor da incerteza,  $\delta$ , ao valor médio obtido a partir da Equação 1 e da Equação 2, respetivamente, de forma a obter os extremos e, conseqüentemente, o intervalo de confiança a 95% para cada um.

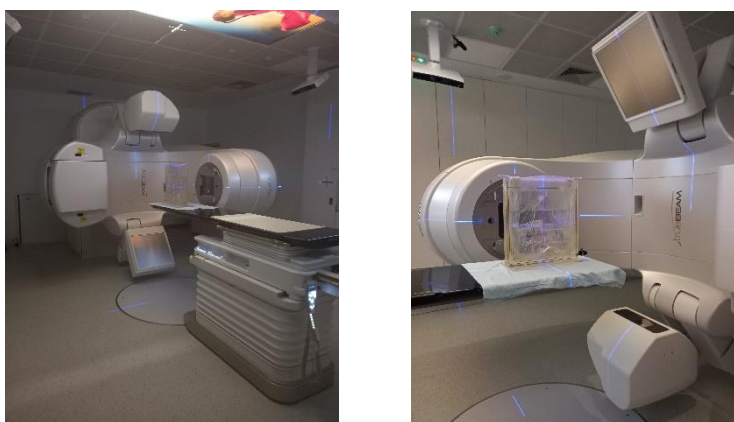
## 2.3. Radioterapia

Nesta secção e à semelhança da secção 2.2, foram avaliados os efeitos do tratamento com olaparib e radioterapia num regime de monoterapia, de forma a estabelecer um racional que permitisse avaliar também a sua posterior combinação, quer esta fosse simultânea ou sequencial.

Anteriormente ao processo de irradiação das células, foi preparada uma suspensão celular com uma concentração de 500 000 células/mL. De seguida, essa suspensão foi distribuída por microtubos de 0,5 mL, tendo de existir um devidamente identificado para cada dose considerada em cada experiência, mais um para a condição de controlo, condição essa que continha meio de cultura com a suspensão celular à concentração indicada. Todos os microtubos foram cheios até ao seu limite, de modo a não ficar espaço aéreo no seu interior, quando fechados. Este facto justifica-se uma vez que nos processos de irradiação se assume que é

irradiado um volume uniforme de água e na presença de ar a dose depositada poderá ser inferior<sup>68</sup>. De seguida, os microtubos foram colocados em sacos de plástico, devidamente selados e, posteriormente, numa caixa de esferovite, para facilitar o seu transporte até ao local de irradiação.

As células foram irradiadas no serviço de radioterapia do CHUC, com exceção do microtubo da condição de controlo, através da utilização de uma estrutura de acrílico, que contém água no seu interior, onde foram colocados todos os microtubos que foram irradiados. A utilização da água reside no facto do efeito da radiação na água ser bem conhecido, o que facilita os cálculos dosimétricos. No processo de irradiação propriamente dito utilizou-se um acelerador linear *TrueBeam* (Varian, 5219), que permitiu a irradiação das células em duas posições angulares distintas (90° e 270°), para cada dose considerada, de forma a garantir uma deposição uniforme da dose. A Figura 9 demonstra o material e a disposição do acelerador linear usados durante o processo de irradiação descrito. As células do microtubo controlo apesar de não irradiadas foram sujeitas às mesmas condições que as restantes, com exceção do processo de irradiação propriamente dito, período durante o qual foram mantidas no exterior da sala que continha o acelerador linear, dentro da caixa de esferovite.



**Figura 9:** Representação do acelerador linear bem como do equipamento utilizado durante o processo de irradiação.

### **2.3.1. Tratamento com radioterapia em regime de monoterapia**

Inicialmente, procedeu-se à avaliação dos efeitos da radioterapia ou do tratamento com olaparib num regime de monoterapia. Para este tipo de avaliação de sobrevivência celular recorreu-se ao ensaio clonogénico, 12 dias após o tratamento (secção 0).

No que diz respeito à radioterapia, as células foram irradiadas de modo a obter uma gama de valores de dose entre os 0,5 e os 10 Gy, com o intuito de posteriormente determinar o valor

da dose letal média, LD<sub>50</sub> (do inglês, *median lethal dose*), para a linha celular MIA PaCa-2. Após a irradiação, as células foram semeadas em placas de 6 poços num volume total de 3 mL por poço. Cada condição foi realizada em duplicado e em cada placa existiu sempre uma condição de controlo, devido à variabilidade existente entre placas. O número de células por poço, variou tendo em conta a dose depositada; ambos os valores estão apresentados na Tabela 6, de modo a que no final do respetivo ensaio fosse possível proceder à contagem de colónias em todos os poços.

**Tabela 6:** Representação dos valores de dose, em Gy, utilizados e da respetiva quantidade de células semeadas por poço, em que 0 Gy representa a condição controlo.

Dose (Gy)	0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10
Nº Células/Poço	400	400	400	400	400	600	600	5000	10000	25000

Relativamente ao tratamento com olaparib em monoterapia, o procedimento seguido foi semelhante ao indicado na secção 2.2.1, uma vez que possuíam a mesma finalidade. Houve, apenas, uma diferença relativamente ao tipo de ensaio usado e à consequente avaliação dos efeitos. Neste caso, as células foram semeadas em placas de 6 poços num volume total de 3 mL por poço. Cada concentração de olaparib foi testada em duplicado, considerando sempre em cada placa uma condição de controlo com veículo, neste caso DMSO. As concentrações de olaparib e a respetiva quantidade de células semeada por poço encontram-se apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Representação dos valores de concentração de olaparib, em µM, utilizados e da respetiva quantidade de células semeadas por poço, em que 0 µM representa a condição controlo e a condição de controlo com veículo.

[Olaparib] (µM)	0	0,5 e 1	2,5	5 e 10	15	20, 30, 50, 65, 85 e 100	115, 130 e 150
Nº Células/Poço	400	400	600	800	1000	1500	2000

Resta, ainda, salientar que em ambos os casos o meio de cultura existente nas placas foi trocado 72 h após a irradiação ou a administração do olaparib, pelo que se considerou sempre que este último esteve em contacto com as células durante esse mesmo período.

### **2.3.2. Combinações**

O regime de tratamento em combinações pressupôs a irradiação das células com consequente administração do olaparib, imediatamente após as células terem sido semeadas, considerando-se, para isso, três abordagens diferentes. Este tipo de regime de combinações foi testado de forma a avaliar o seu efeito, quando comparado à irradiação e administração isolada de olaparib (secção 2.3.1).

#### **2.3.2.1. Combinação simultânea com concentração de olaparib variável**

O tratamento com olaparib ou com radioterapia em monoterapia possibilitou o estabelecimento de uma razão entre o IC<sub>50</sub> do fármaco e o LD<sub>50</sub> obtido com a radioterapia. A concentração de olaparib determinada foi proporcional a cada dose (0,25 a 4 Gy), através da constante de proporcionalidade definida pelo razão entre o IC<sub>50</sub> e o LD<sub>50</sub>.

#### **2.3.2.2. Combinação simultânea com concentração fixa de olaparib**

Nesta abordagem, a concentração de olaparib manteve-se fixa e igual a 1 µM. A dose depositada variou entre 0,25 e 4 Gy. A análise deste regime de combinação diferiu dos restantes dois apresentados, como se encontra apresentado na secção 2.3.4.

#### **2.3.2.3. Combinação sequencial com concentração de olaparib variável**

Para além do regime de combinação simultânea foi, ainda, avaliado o regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h após a irradiação, com concentrações iguais ao primeiro caso apresentado no regime de combinação simultânea.

As doses de radiação entregues para o regime de combinações foram iguais para os três casos apresentados, bem como o número de células que foi colocado em cada poço, para cada condição. As doses, o número de células e as concentrações de olaparib utilizadas encontram-se apresentadas na Tabela 8, para a combinação simultânea e sequencial com concentração variável. A combinação simultânea com concentração fixa de olaparib apenas difere no facto de a concentração deste ser sempre ser igual a 1 µM em todos os poços.

**Tabela 8:** Representação dos valores de dose, em Gy, e da respetiva concentração de olaparib, em  $\mu\text{M}$ , utilizados nos regimes de combinação simultânea e sequencial e da respetiva quantidade de células por poço, em que a letra C representa o grupo de Controlo.

Dose (Gy)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	3	4
[Olaparib] ( $\mu\text{M}$ )	-	0,69	1,39	2,78	4,17	5,55	8,33	11,11
Nº Células/Poço	400	400	400	600	800	800	1600	2000

### 2.3.3. Avaliação da sobrevivência celular através do ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico é o método mais adequado para avaliar os efeitos da radiação ionizante *in vitro*, podendo, também, ser utilizado para testar o efeito citotóxico de alguns fármacos<sup>69</sup>. Este ensaio permite aferir a sobrevivência celular após a exposição a um estímulo externo, uma vez que avalia a capacidade de uma única célula dar origem a uma colónia, a qual consiste num aglomerado de, pelo menos, 50 células<sup>69</sup>. Como já foi referido, os tratamentos considerados provocam danos no DNA, o que faz com que, em alguns casos, as células percam a sua capacidade de divisão, o que as impossibilita de formar colónias, pelo que apenas uma fração das células semeadas consegue manter essa capacidade<sup>69</sup>.

As células MIA Paca-2 foram tratadas segundo os procedimentos descritos nas secções 2.3.2.1, 2.3.2.2 e 2.3.2.3. Três dias após a administração de olaparib trocou-se o meio de cultura, de forma a garantir que o fármaco apenas tenha estado em contacto com as células durante 72h. Decorridos os 12 dias desde o momento em que as células foram semeadas nas placas de 6 poços, o meio de cultura foi descartado, lavando-se, de seguida, cada poço com 2 mL de PBS, de forma a eliminar qualquer vestígio de meio. Depois disso, adicionaram-se 2 mL de metanol, agente responsável por fixar as células, e incubaram-se as placas durante 30 minutos. Terminado esse período, o mesmo foi descartado e as placas foram deixadas a secar. Seguidamente, procedeu-se à coloração das colónias, durante 10 minutos, com uma solução de 0,5% de violeta de cristal (Sigma, C3886), corante que tem a capacidade de se ligar ao DNA. Por fim, o excesso de corante foi removido e as placas foram lavadas, através da sua imersão num recipiente com água, para que todo o corante não ligado pudesse ser eliminado.

Após a secagem completa das placas, procedeu-se à contagem do número de colónias existente em cada poço, de forma a calcular a eficiência de placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (FS), de acordo com a Equação 5 e Equação 6, respetivamente.

$$PE = \frac{N^{\circ} \text{ de colónias contadas}}{N^{\circ} \text{ de células semeadas}}$$

**Equação 5:** Fórmula para o cálculo da eficiência de placa.

$$FS = \frac{PE \text{ (tratamento)}}{PE \text{ (controlo)}}$$

**Equação 6:** Fórmula para o cálculo do Fator de Sobrevivência.

### 2.3.4. Análise estatística

Com o intuito de proceder à análise estatística dos resultados recorreu-se ao programa *GraphPad Prism*, versão 9.4.0 para *Windows* (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Numa primeira fase, traçou-se a curva de sobrevivência para os dados resultantes do ensaio clonogénico para o tratamento com radioterapia, num regime de monoterapia. Para isso, ajustaram-se os valores de FS em função da dose (em Gy) a uma regressão não linear. Com esta finalidade testaram-se dois modelos de agressão celular: o linear (Equação 7) e o linear quadrático. De entre os modelos de agressão celular testados, o que melhor se ajustou ao conjunto de resultados foi o linear quadrático, descrito pela Equação 8. A partir dessa curva obteve-se o valor de LD<sub>50</sub>, que corresponde à dose que é letal para 50% da população de células considerada.

$$FS = e^{-\alpha D}$$

**Equação 7:** Expressão que define o modelo linear, em que **FS** representa o fator de sobrevivência,  **$\alpha$**  o coeficiente da componente linear, em Gy<sup>-1</sup> e **D** a dose, em Gy.

$$FS = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

**Equação 8:** Expressão que define o modelo linear quadrático, em que **FS** representa o fator de sobrevivência,  **$\alpha$**  o coeficiente da componente linear, em Gy<sup>-1</sup>,  **$\beta$**  o coeficiente da componente quadrática, em Gy<sup>-2</sup>, e **D** a dose, em Gy.

No seguimento do descrito, traçou-se a curva de dose-resposta para o tratamento com olaparib, num regime de monoterapia, pelo que os valores do FS foram normalizados aos do controlo com veículo. Com essa finalidade, ajustaram-se os dados a uma regressão não linear, de forma a obter um gráfico que represente os valores do FS em função do log<sub>10</sub> da concentração do inibidor, com um declive variável, modelo este que devolve o valor do IC<sub>50</sub> para esta modalidade de tratamento.



As combinações da radioterapia com o olaparib com uma concentração variável, nos diferentes regimes foram avaliadas de acordo com o método de *Chou-Talalay*<sup>65</sup>, em concordância com o que foi feito na secção 2.2.5. Desta forma, o CI para estes casos foi calculado de acordo com a Equação 9. O DRI foi, também, calculado, sendo que para o olaparib o mesmo foi feito de acordo com a Equação 2 (secção 2.2.5) e no da radioterapia com a Equação 10.

$$CI = \frac{IC_{50}(\text{olaparib na combinação})}{IC_{50}(\text{olaparib em monoterapia})} + \frac{LD_{50}(\text{radioterapia na combinação})}{LD_{50}(\text{radioterapia isoladamente})}$$

**Equação 9:** Fórmula para o cálculo do índice de combinação, para as combinações de radioterapia com olaparib.

$$DRI = \frac{LD_{50}(\text{radioterapia isoladamente})}{LD_{50}(\text{radioterapia na combinação})}$$

**Equação 10:** Fórmula para o cálculo do índice de redução de dose da radioterapia, para as combinações em que esta seja uma das formas de tratamento.

A combinação de radioterapia com olaparib com uma concentração fixa foi avaliada através da determinação do valor SER (do inglês, *sensitization enhancement ratio*), de forma a aferir se o olaparib possui um efeito radiosensibilizador, ou seja, se através da sua combinação com a radioterapia poderá proporcionar uma redução da dose. Este parâmetro foi calculado a partir da Equação 11<sup>70</sup>.

$$SER = \frac{LD_{50}(\text{radioterapia isoladamente})}{LD_{50}(\text{combinação radioterapia} + 1 \mu\text{M olaparib})}$$

**Equação 11:** Fórmula para o cálculo do SER, para a combinação de radioterapia e olaparib a uma concentração fixa.



## **3. Resultados<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Os resultados descritos ao longo deste capítulo foram obtidos em coautoria com o Mestre Eurico Pereira

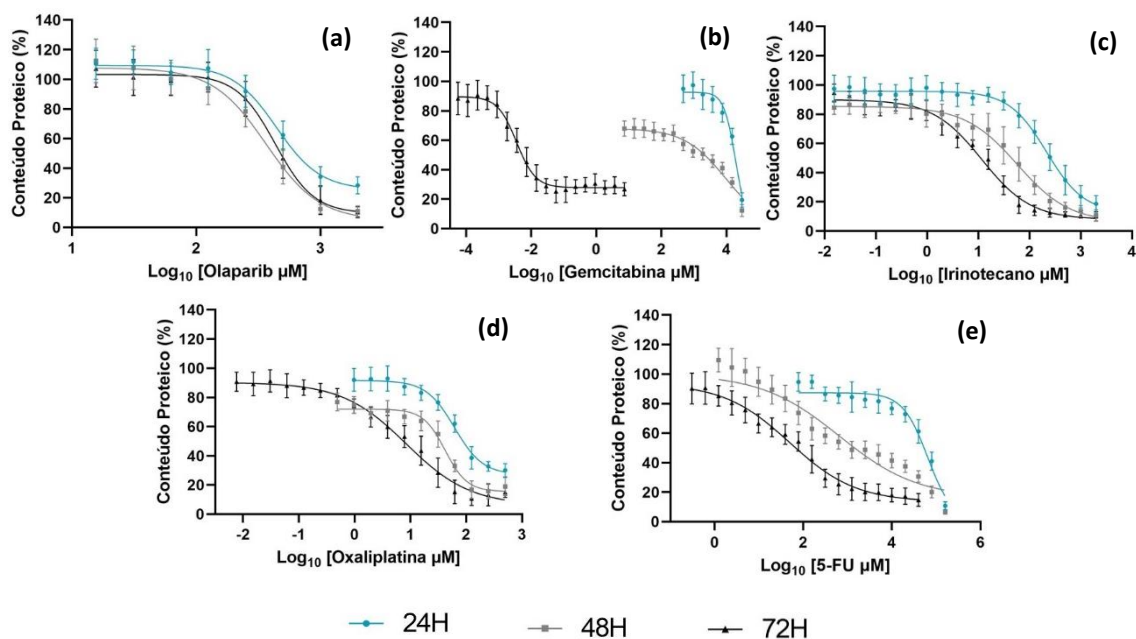


### 3.1. Avaliação dos efeitos citotóxicos do olaparib e DNA-DA

#### 3.1.1. Regime de monoterapia

Primeiramente, avaliaram-se os efeitos citotóxicos de todos os DNA-DA e do olaparib, pelo que se recorreu ao ensaio de SRB, de forma a determinar o conteúdo proteico celular, 24, 48 e 72h após o tratamento com cada fármaco, num regime de monoterapia. Assim, o objetivo central desta secção foi a determinação do IC<sub>50</sub> de cada fármaco, para cada tempo considerado.

Na Figura 10 estão representados os gráficos que evidenciam o conteúdo proteico das células em função do logaritmo da concentração de cada fármaco utilizado, 24, 48 e 72h após a sua administração. A partir de cada um dos gráficos presentes na Figura 10 extraiu-se o valor de IC<sub>50</sub>, para cada instante temporal, conjugados com os respetivos intervalos de confiança a 95% (IC95%) e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), valores esses que se encontram representados na Tabela 9.



**Figura 10:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de monoterapia com olaparib (a), gemcitabina (b), irinotecano (c), oxaliplatina (d) ou 5-fluorouracilo (e), 24h (azul), 48h (cinzento) e 72h (preto) após a administração do fármaco. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

Os resultados apresentados na Figura 10 denotam que ocorreu uma diminuição do conteúdo proteico, com o aumento da concentração dos diversos fármacos, o que se verificou para todos os tempos considerados (24h, 48h e 72h). Assim, é possível aferir que a resposta da linha celular MIA PaCa-2 ao tratamento com olaparib ou com os DNA-DA considerados foi dependente da concentração.

**Tabela 9:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib, gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina ou 5-fluorouracilo, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

	24h			48h			72h		
	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>
<b>Olaparib</b>	443,7	[395,9; 501,6]	0,93	366,3	[324,3; 417,6]	0,93	433,9	[390,7; 486,4]	0,93
<b>Gemcitabina</b>	19046	[16378; 20390]	0,90	9574	[7352; 11367]	0,88	0,0035	[0,0030; 0,0041]	0,92
<b>Irinotecano</b>	215,8	[180,9; 269,2]	0,93	57,8	[46,4; 74,5]	0,93	11,8	[10,2; 13,6]	0,96
<b>Oxaliplatina</b>	61,8	[54,4; 70,7]	0,93	41,9	[36,8; 47,8]	0,93	8,3	[6,8; 10,6]	0,94
<b>5-FU</b>	64440	[58324; 70781]	0,91	653,2	[371,1; 1385,0]	0,89	49,7	[35,1; 67,0]	0,93

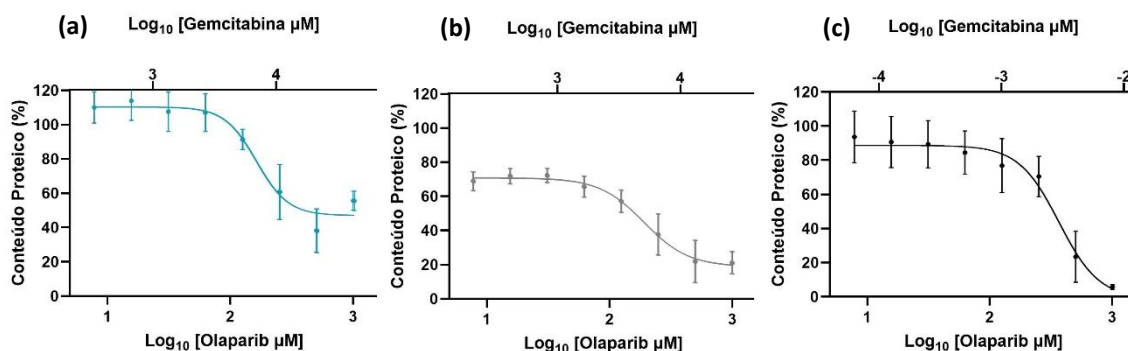
Conjugando os dados da Figura 10 e da Tabela 9, observa-se que a resposta das células ao tratamento com gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina e 5-fluorouracilo pode, também, ser considerada dependente do tempo, uma vez que com o aumento do período de incubação de cada fármaco houve uma diminuição do conteúdo proteico, o que também se concretizou numa diminuição do valor de IC<sub>50</sub>. No caso do tratamento com olaparib, o mesmo não se verificou, já que o valor de IC<sub>50</sub> não variou significativamente para os três tempos de incubação.

### 3.1.2. Regime de combinação simultânea

Em segundo lugar, avaliaram-se os efeitos citotóxicos da combinação de olaparib com DNA-DA num regime de concomitância, 24h, 48h e 72h após a sua administração, com o objetivo de determinar o CI e o DRI para cada fármaco da combinação, tendo para isso, também, por base os resultados obtidos na secção 3.1.1. Assim, os fármacos foram combinados a um rácio constante que corresponde à proporção entre o IC<sub>50</sub> do DNA-DA e o IC<sub>50</sub> do olaparib, para cada tempo considerado.

### 3.1.2.1. Olaparib e gemcitabina

Na Figura 11 encontram-se representadas as curvas dose-resposta para a combinação simultânea de olaparib com gemcitabina, para os diferentes tempos considerados em que essa resposta foi avaliada. O conteúdo proteico, em %, está expresso em função do logaritmo da concentração dos dois fármacos. Complementando este conjunto de resultados com os valores obtidos para o CI e DRI (Tabela 10), constatou-se que a combinação referida possui um efeito moderadamente sinérgico, com um CI de 0,73 para as 24h, sendo estatisticamente diferente dos CI obtidos para os restantes tempos de avaliação (Tabela 5). O aumento do tempo de incubação provoca um aumento nos valores do CI, obtendo-se o valor de 1,05 para as 48h e de 1,68 para as 72h. Desta forma, o efeito da combinação é considerado praticamente aditivo, para as 48h, e antagónico, para as 72h (Tabela 5). Para todos os casos, os valores de DRI obtidos foram sempre superiores a 1, o que indica uma diminuição da concentração de ambos os fármacos na combinação, quando comparada com a sua administração isolada.



**Figura 11:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com gemcitabina, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 10:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e gemcitabina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

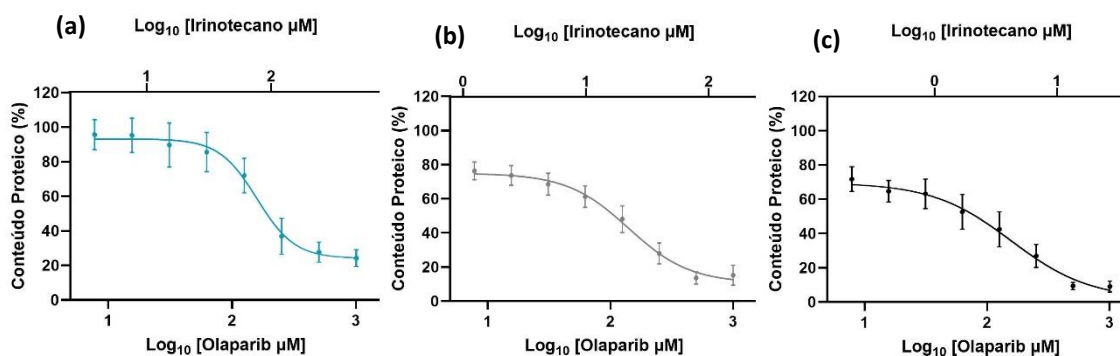
		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC95% ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
24h	Olaparib	162,1	[141,3; 186,6]	0,84	0,73	[0,63; 0,83]	2,74	[2,19; 3,28]
	Gemcitabina	6959	[6067; 8008]				2,74	[2,20; 3,27]
48h	Olaparib	191,9	[164,4; 226,6]	0,88	1,05	[0,85; 1,24]	1,91	[1,47; 2,35]
	Gemcitabina	5015	[4297; 5922]				1,91	[1,35; 2,47]
72h	Olaparib	364,9	[304,5; 586,9]	0,85	1,68	[1,12; 2,24]	1,19	[0,95; 1,43]
	Gemcitabina	0,0030	[0,0025; 0,0048]				1,19	[0,44; 1,94]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico:  $0,3 < CI < 0,7$ ; moderadamente sinérgico:  $0,7 < CI < 0,85$ ; ligeiramente sinérgico:  $0,85 < CI < 0,90$ ; praticamente aditivo:  $0,90 < CI < 1,10$ ; ligeiramente antagónico:  $1,10 < CI < 1,20$ ; moderadamente antagónico:  $1,20 < CI < 1,45$ ; antagónico:  $1,45 < CI < 3,30$

### 3.1.2.2. Olaparib e irinotecano

As representações gráficas presentes na Figura 12 permitiram obter o valor do IC<sub>50</sub> do olaparib e do irinotecano no regime de combinação simultânea, que foram em todos os casos considerados estatisticamente inferiores aos obtidos para cada fármaco no regime de monoterapia (Anexo I, Tabela 27).

Os valores do CI para a administração concomitante de olaparib e de irinotecano (Tabela 11) revelam que esta combinação possui um efeito moderadamente sinérgico que se mantém constante ao longo do tempo de incubação (0,71; 0,77 e 0,72 para 24h, 48h e 72h, respetivamente) (Tabela 5). Esta combinação permite que a concentração de ambos os fármacos diminua 2,80 e 2,77 vezes para as 24h e 72h, respetivamente. No caso das 48h há uma redução na concentração de 2,61 para o olaparib e 2,6 vezes para o irinotecano, quando comparado com o tratamento com os fármacos num regime de monoterapia.



**Figura 12:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com irinotecano, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 11:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e irinotecano e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

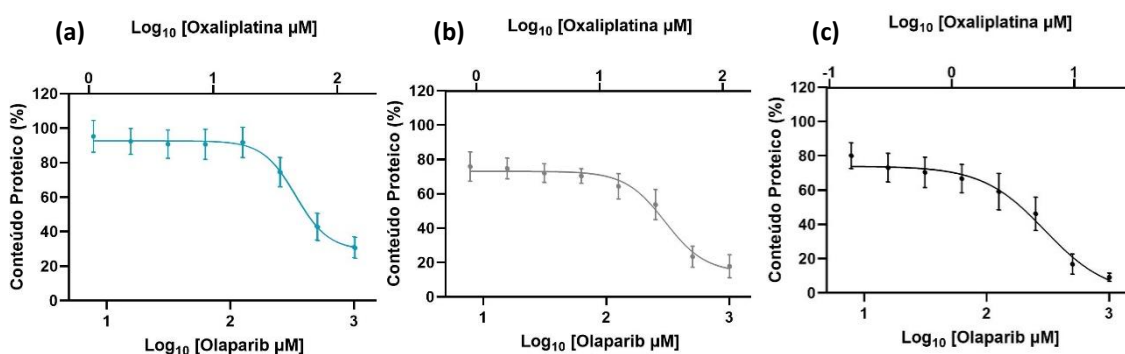
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
24h	Olaparib	158,4	[141,6; 177,9]	0,90	0,71	[0,60; 0,83]	2,80	[2,30; 3,30]
	Irinotecano	77,1	[68,9; 86,5]				2,80	[2,03; 3,57]
48h	Olaparib	140,6	[124,1; 159,9]	0,94	0,77	[0,62; 0,91]	2,61	[2,09; 3,12]
	Irinotecano	22,2	[19,6; 25,2]				2,60	[1,77; 3,44]
72h	Olaparib	156,6	[123,6; 211,9]	0,90	0,72	[0,53; 0,92]	2,77	[1,74; 3,81]
	Irinotecano	4,3	[3,4; 5,8]				2,77	[1,71; 3,83]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30



### 3.1.2.3. Olaparib e oxaliplatina

No caso da combinação simultânea de olaparib com oxaliplatina (Figura 13; Tabela 12) apenas se verificou uma diminuição estatisticamente significativa do valor de IC<sub>50</sub> de cada fármaco em combinação após 24h de incubação, quando comparado com os valores de IC<sub>50</sub> dos fármacos em monoterapia (Anexo I, Tabela 28). Esta combinação determina um efeito que varia de antagónico, com valores de CI de 1,51 e 1,64 para 24h e 48h, a moderadamente antagónico para as 72h (CI = 1,37) (Tabela 5). É de salientar que os valores de CI, para os diferentes tempos de incubação considerados, não são estatisticamente diferentes.



**Figura 13:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com oxaliplatina, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 12:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e oxaliplatina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

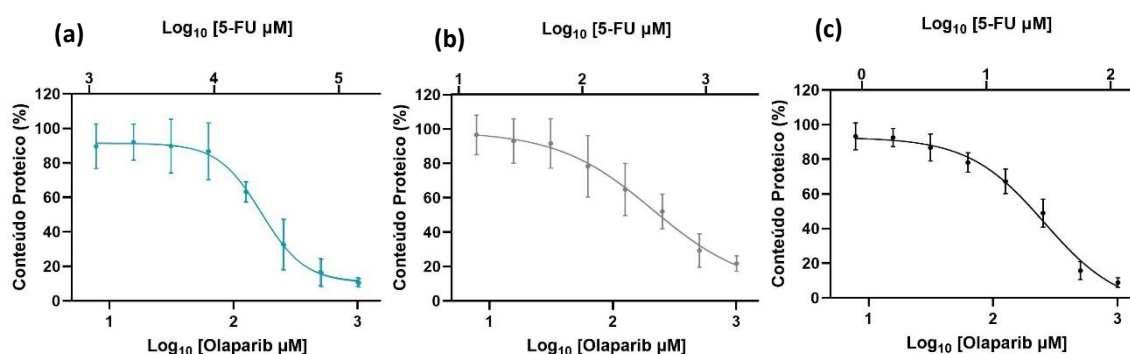
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
24h	Olaparib	334,0	[297,1; 379,2]	0,90	1,51	[1,30; 1,71]	1,33	[1,08; 1,58]
	Oxaliplatina	46,5	[41,4; 52,8]				1,33	[1,07; 1,59]
48h	Olaparib	299,9	[267,7; 345,0]	0,91	1,64	[1,40; 1,88]	1,22	[0,97; 1,47]
	Oxaliplatina	34,3	[30,7; 39,5]				1,22	[0,97; 1,47]
72h	Olaparib	298,1	[241,4; 487,3]	0,90	1,37	[0,53; 0,92]	1,46	[1,13; 1,79]
	Oxaliplatina	5,8	[4,7; 9,5]				1,46	[0,46; 2,45]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30

### 3.1.2.4. Olaparib e 5-fluorouracilo

O regime de combinação simultânea de olaparib com 5-fluorouracilo provocou uma diminuição estatisticamente significativa nos valores de IC<sub>50</sub> dos dois fármacos na combinação

(Figura 14), quando comparado com o regime de monoterapia, com exceção do IC<sub>50</sub> do 5-fluorouracilo às 48h (Anexo I, Tabela 29). No que diz respeito aos efeitos desta combinação (Tabela 13), estes variam de moderadamente sinérgico, com um CI igual a 0,75 para as 24h, a ligeiramente antagónico, com um CI de 1,15 e 1,18 para as 48h e 72h, respetivamente, apesar de os valores não serem estatisticamente diferentes entre si (Tabela 5). O valor do DRI associado para ambos os fármacos às 24h foi de 2,67, o que significa que houve uma redução na concentração dos mesmos de 2,67 vezes relativamente à concentração usada para cada um deles isoladamente. Quanto ao DRI para as 48 e 72h de incubação, verificou-se uma diminuição da concentração de ambos os fármacos de 1,75 e 1,69 vezes, respetivamente.



**Figura 14:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação simultânea de olaparib com 5-fluorouracilo, 24h (a), 48h (b) e 72h (c) após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 3 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 13:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 24h, 48h e 72h após a administração da combinação simultânea de olaparib e 5-fluorouracilo e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
24h	Olaparib	116,2	[141,1; 198,5]	0,90	0,75	[0,63; 0,87]	2,67	[2,04; 3,29]
	5-FU	24136	[20491; 28827]				2,67	[2,09; 3,25]
48h	Olaparib	209,8	[136,1; 311,3]	0,84	1,15	[0,68; 1,62]	1,75	[0,87; 2,63]
	5-FU	374,1	[242,6; 555,2]				1,75	[0,61; 2,88]
72h	Olaparib	256,0	[210,7; 354,2]	0,96	1,18	[0,87; 1,49]	1,69	[1,01; 2,38]
	5-FU	29,3	[24,1; 40,5]				1,69	[1,11; 2,28]

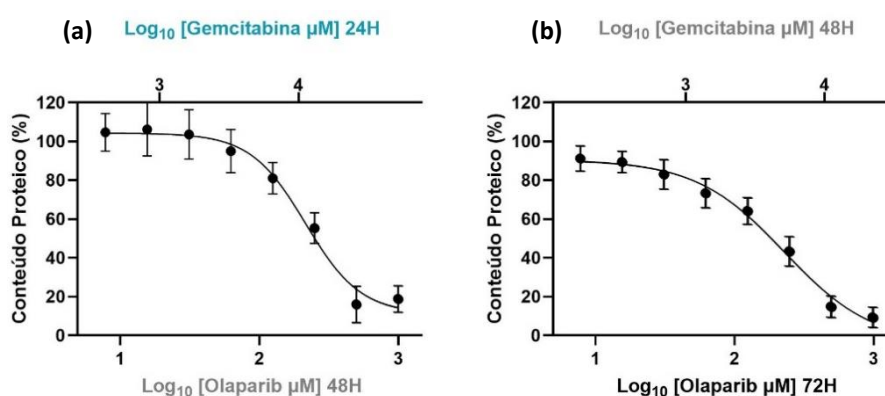
**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30

### 3.1.3. Regime de combinação sequencial: olaparib administrado 24h antes do DNA-DA

Para além do regime de combinação já apresentado, foi, também, avaliado outro regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h antes do DNA-DA, pelo que a avaliação do conteúdo proteico foi realizada 48h e 72h depois da administração do olaparib e 24h e 48h depois da do 2º fármaco (gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina ou 5-fluorouracilo). Da mesma forma, os fármacos foram combinados a um rácio constante que corresponde à proporção entre o  $IC_{50}$  dos DNA-DA, às 24h ou 48h, e o  $IC_{50}$  do olaparib, às 48h ou 72h, respetivamente.

#### 3.1.3.1. Olaparib e gemcitabina

A administração sequencial de olaparib 24h antes da gemcitabina (Figura 15; Tabela 14) provocou uma diminuição estatisticamente significativa dos valores de  $IC_{50}$  de ambos os fármacos, tanto para as 48h e 72h no caso do olaparib como para as 24h e 48h no caso da gemcitabina (Anexo II, Tabela 30). Os CI determinados para esta combinação (1,18 e 1,06 para 48h/24h e 72h/48h, respetivamente) são estatisticamente diferentes entre si, o que permite inferir que a mesma possui um efeito que passa de ligeiramente antagónico a praticamente aditivo, com o aumento do tempo de incubação (Tabela 5).



**Figura 15:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com gemcitabina, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

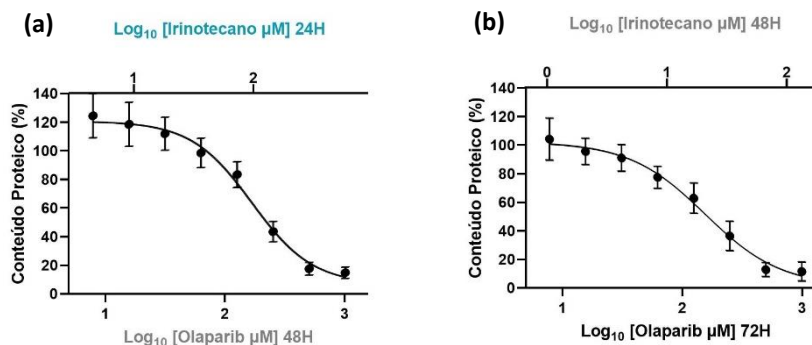
**Tabela 14:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de gemcitabina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC95% ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	Olaparib	215,4	[187,5; 248,8]	0,90	1,18	[1,01; 1,34]	1,70	[1,35; 2,06]
24h	Gemcitabina	11200	[9750; 12939]				1,70	[1,37; 2,04]
72h	Olaparib	230,2	[136,1; 311,3]	0,95	1,06	[0,68; 1,62]	1,88	[1,26; 2,51]
48h	Gemcitabina	5078	[4255; 6641]				1,88	[1,16; 2,61]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico:  $0,3 < CI < 0,7$ ; moderadamente sinérgico:  $0,7 < CI < 0,85$ ; ligeiramente sinérgico:  $0,85 < CI < 0,90$ ; praticamente aditivo:  $0,90 < CI < 1,10$ ; ligeiramente antagónico:  $1,10 < CI < 1,20$ ; moderadamente antagónico:  $1,20 < CI < 1,45$ ; antagónico:  $1,45 < CI < 3,30$

### 3.1.3.2. Olaparib e irinotecano

A administração de olaparib com posterior adição de irinotecano 24h depois (Figura 16; Tabela 15) teve como resultado a obtenção de valores de CI inferiores a 1, mais concretamente de 0,91 concretizando-se num efeito praticamente aditivo para as 48h/24h, e de 0,72 podendo ser classificado como um efeito moderadamente sinérgico para as 72h/48h (Tabela 5). Esta combinação permitiu uma redução na concentração de ambos os fármacos de 2,21 vezes para o primeiro tempo considerado, que aumentou para 2,79 vezes no segundo.



**Figura 16:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com irinotecano, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

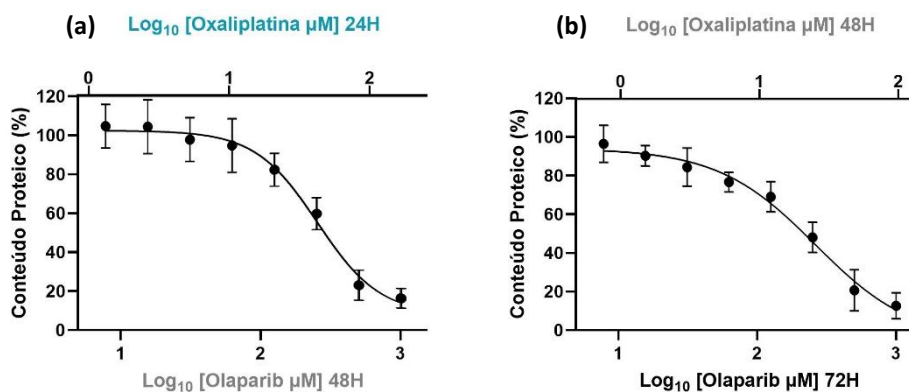
**Tabela 15:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de irinotecano e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respectivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC95% ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	Olaparib	166,1	[142,9; 196,1]	0,94	0,91	[0,73; 1,08]	2,21	[1,70; 2,71]
24h	Irinotecano	97,9	[84,2; 115,5]				2,21	[1,53; 2,88]
72h	Olaparib	155,6	[127,9; 198,1]	0,93	0,72	[0,54; 0,90]	2,79	[1,96; 3,62]
48h	Irinotecano	20,7	[17,0; 26,4]				2,79	[1,68; 3,90]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico:  $0,3 < CI < 0,7$ ; moderadamente sinérgico:  $0,7 < CI < 0,85$ ; ligeiramente sinérgico:  $0,85 < CI < 0,90$ ; praticamente aditivo:  $0,90 < CI < 1,10$ ; ligeiramente antagónico:  $1,10 < CI < 1,20$ ; moderadamente antagónico:  $1,20 < CI < 1,45$ ; antagónico:  $1,45 < CI < 3,30$

### 3.1.3.3. Olaparib e oxaliplatina

Quando comparada com a utilização isolada de olaparib e oxaliplatina, a sua combinação sequencial com o olaparib a ser administrado 24h antes (Figura 17; Tabela 16) foi responsável pela diminuição estatisticamente significativa do IC<sub>50</sub> dos fármacos apenas para as 48h e 24h, respetivamente (Anexo II, Tabela 32). Neste caso, os efeitos da combinação não foram dependentes do tempo de exposição das células aos fármacos, uma vez que se verificou um efeito moderadamente antagónico tanto para 48h/24h (CI = 1,39) como para 72h/48h (CI = 1,21) (Tabela 5).



**Figura 17:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com oxaliplatina, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

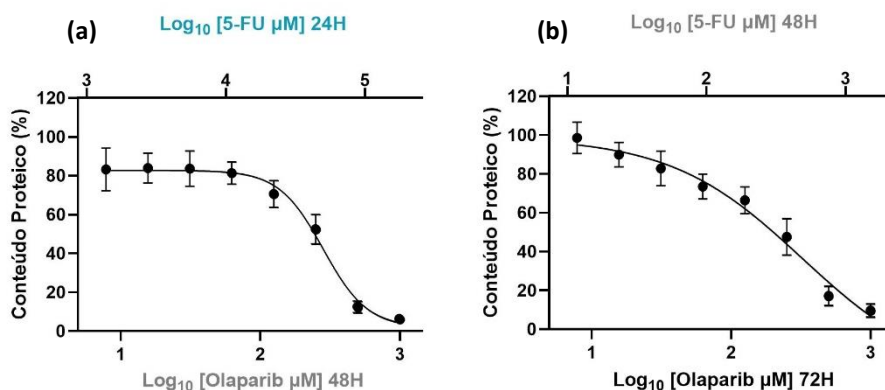
**Tabela 16:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de oxaliplatina e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC95% ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	Olaparib	253,8	[216,4; 315,1]	0,91	1,39	[1,11; 1,66]	1,44	[1,04; 1,85]
24h	Oxaliplatina	42,8	[36,5; 53,2]				1,44	[1,04; 1,85]
72h	Olaparib	262,0	[202,0; 498,2]	0,93	1,31	[0,98; 1,43]	1,66	[1,23; 2,09]
48h	Oxaliplatina	25,3	[19,5; 48,2]				1,66	[1,21; 2,10]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico:  $0,3 < CI < 0,7$ ; moderadamente sinérgico:  $0,7 < CI < 0,85$ ; ligeiramente sinérgico:  $0,85 < CI < 0,90$ ; praticamente aditivo:  $0,90 < CI < 1,10$ ; ligeiramente antagónico:  $1,10 < CI < 1,20$ ; moderadamente antagónico:  $1,20 < CI < 1,45$ ; antagónico:  $1,45 < CI < 3,30$

### 3.1.3.4. Olaparib e 5-fluorouracilo

Para a combinação sequencial em que o olaparib foi adicionado 24h antes do 5-fluorouracilo cujas representações gráficas se encontram na Figura 18, constatou-se uma diminuição estatisticamente significativa apenas dos valores de IC<sub>50</sub> para a condição em que o primeiro esteve em contacto com as células durante 48h e o segundo durante 24h, isto quando comparado com o tratamento num regime de monoterapia para os mesmos instantes temporais (Anexo II, Tabela 33). Os efeitos desta combinação são considerados antagónicos, uma vez que os CI determinados (Tabela 17) foram de 1,54 e 1,48 para 48h/24h e 72h/48h, respetivamente, não possuindo uma diferença estatisticamente significativa entre si (Tabela 5).



**Figura 18:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de olaparib com 5-fluorouracilo, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 17:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de 5-fluorouracilo e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	Olaparib	282,7	[258,1; 312,5]	0,95	1,54	[1,37; 1,72]	1,29	[1,07; 1,52]
24h	5-FU	49732	[45397; 54978]				1,29	[1,11; 1,48]
72h	Olaparib	322,1	[217,1; 1830]	0,94	1,48	[1,01; 1,96]	1,34	[0,88; 1,82]
48h	5-FU	484,9	[326,9; 2755]				1,34	[0,62; 2,08]

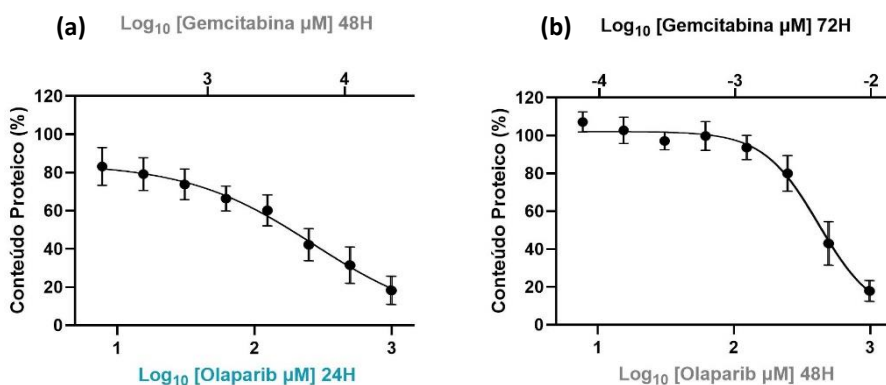
**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30

### 3.1.4. Regime de combinação sequencial: olaparib administrado 24h depois do DNA-DA

Por fim, foi, ainda, avaliado um outro regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h depois do DNA-DA, pelo que a avaliação do conteúdo proteico foi realizada 48h e 72h depois da administração do DNA-DA, para cada caso, e 24h e 48h depois da do olaparib. Tal como anteriormente, os fármacos foram combinados a um rácio constante que corresponde à proporção entre o IC<sub>50</sub> dos DNA-DA, às 48h ou 72h, e o IC<sub>50</sub> do olaparib, às 24h ou 48h, respetivamente.

#### 3.1.4.1. Olaparib e gemcitabina

A administração sequencial de olaparib 24h depois da gemcitabina (Figura 19; Tabela 18) provocou uma diminuição estatisticamente significativa dos valores de IC<sub>50</sub> de ambos os fármacos, no caso em que o olaparib e a gemcitabina estiveram 24h e 48h em contacto com as células, respetivamente (Anexo III, Tabela 34). Os CI determinados para esta combinação foram 1,22 e 2,31 para as 48h e 72h após a administração do primeiro fármaco. Estes valores foram estatisticamente diferentes entre si e permitiram inferir que a mesma possui um efeito que passa de moderadamente antagónico a antagónico, com o aumento do tempo em que as células estão em contacto com os fármacos (Tabela 5).



**Figura 19:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de gemcitabina com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 18:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração da gemcitabina e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

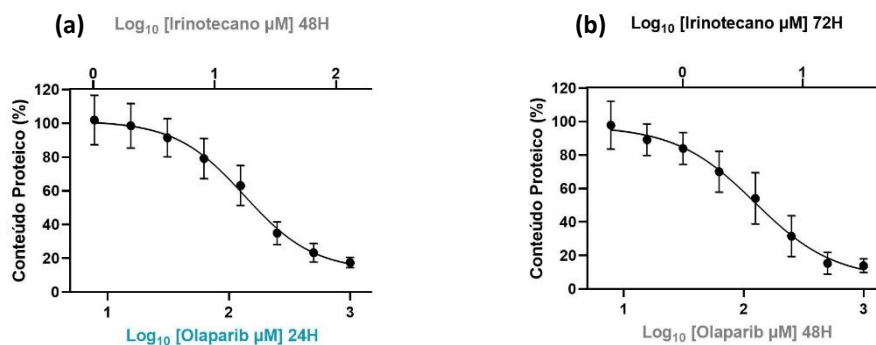
		IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	Gemcitabina	5833	[3744; 7223]	0,87	1,22	[0,87; 1,57]	1,64	[0,94; 2,34]
24h	Olaparib	270,3	[173,5; 334,7]				1,64	[1,01; 2,27]
72h	Gemcitabina	0,0041	[0,0035; 0,0057]	0,94	2,31	[1,59; 3,03]	0,87	[0,48; 1,25]
48h	Olaparib	423,3	[360,7; 597,7]				0,87	[0,49; 1,24]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30

### 3.1.4.2. Olaparib e irinotecano

A administração de irinotecano com posterior adição de olaparib 24h depois (Figura 20; Tabela 19) teve como resultado a obtenção de valores de CI inferiores a 1, mais concretamente de 0,61 e de 0,68, o que confere um efeito sinérgico a esta combinação, para qualquer um dos tempos em que a mesma foi avaliada (Tabela 5). Esta combinação permitiu uma redução na concentração de ambos os fármacos de 3,29 vezes para as 24h/48h, que diminuiu para 2,96 vezes para as 48h/72h.





**Figura 20:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de irinotecano com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 3 experiências independentes realizadas em triplicado.

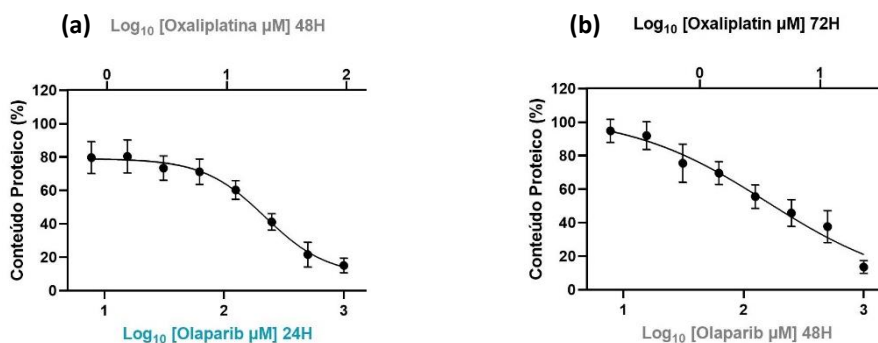
**Tabela 19:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração do irinotecano e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC95% ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
<b>48h</b>	Irinotecano	17,5	[14,3; 21,9]	0,91	<b>0,61</b>	[0,46; 0,75]	3,29	[2,03; 4,55]
<b>24h</b>	Olaparib	134,7	[110,4; 168,4]				3,29	[2,36; 4,22]
<b>72h</b>	Irinotecano	4,0	[3,0; 5,7]	0,90	<b>0,68</b>	[0,46; 0,89]	2,96	[1,60; 4,30]
<b>48h</b>	Olaparib	123,9	[92,2; 177,4]				2,96	[1,61; 4,30]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico:  $0,3 < CI < 0,7$ ; moderadamente sinérgico:  $0,7 < CI < 0,85$ ; ligeiramente sinérgico:  $0,85 < CI < 0,90$ ; praticamente aditivo:  $0,90 < CI < 1,10$ ; ligeiramente antagónico:  $1,10 < CI < 1,20$ ; moderadamente antagónico:  $1,20 < CI < 1,45$ ; antagónico:  $1,45 < CI < 3,30$

### 3.1.4.3. Olaparib e oxaliplatina

A combinação sequencial de oxaliplatina e olaparib, sendo o olaparib administrado 24h após a oxaliplatina (Figura 21; Tabela 20), providenciou uma redução significativa dos valores de IC<sub>50</sub> dos dois fármacos (Anexo III, Tabela 36). Os valores de CI obtidos (0,99 para as 24h/48h e 0,86 para as 48h/72h) verificam a existência de um efeito praticamente aditivo, com um DRI associado de 2,01 para a avaliação das 48h após a administração do primeiro fármaco e um efeito ligeiramente sinérgico, com um DRI de 2,33 para a avaliação das 72h após a administração do primeiro fármaco (Tabela 5).



**Figura 21:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de oxaliplatina com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média  $\pm$  erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 4 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 20:** Apresentação dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração da oxaliplatina e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

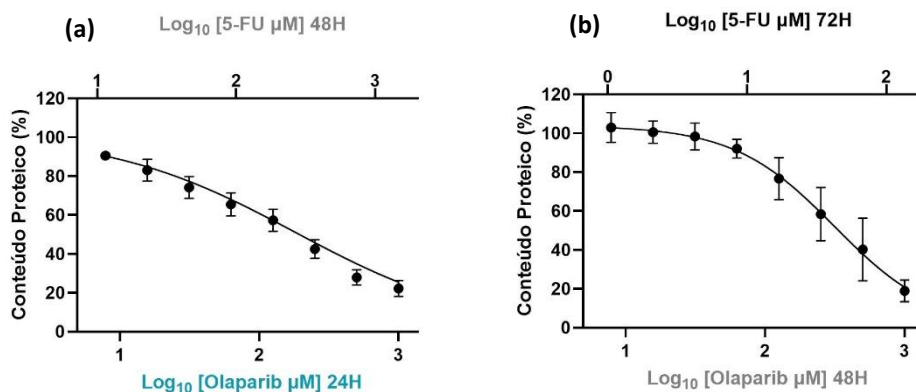
		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC95% ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	Oxaliplatina	20,9	[17,5; 26,8]	0,92	0,99	[0,77; 1,22]	2,01	[1,37; 2,65]
24h	Olaparib	220,6	[184,8; 283,5]				2,01	[1,38; 2,64]
72h	Oxaliplatina	3,6	[2,1; 5,1]	0,90	0,86	[0,58; 1,14]	2,33	[1,20; 3,46]
48h	Olaparib	157,1	[92,5; 220,5]				2,33	[1,32; 3,35]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico:  $0,3 < CI < 0,7$ ; moderadamente sinérgico:  $0,7 < CI < 0,85$ ; ligeiramente sinérgico:  $0,85 < CI < 0,90$ ; praticamente aditivo:  $0,90 < CI < 1,10$ ; ligeiramente antagónico:  $1,10 < CI < 1,20$ ; moderadamente antagónico:  $1,20 < CI < 1,45$ ; antagónico:  $1,45 < CI < 3,30$

### 3.1.4.4. Olaparib e 5-fluorouracilo

Para a combinação sequencial em que o olaparib foi adicionado 24h depois do 5-fluorouracilo (Figura 22; Tabela 21), constatou-se uma diminuição estatisticamente significativa apenas do valor de IC<sub>50</sub> do olaparib para as 24h, isto quando comparado com o tratamento num regime de monoterapia para o mesmo instante temporal (Anexo III,

Tabela 37). O efeito desta combinação varia de ligeiramente sinérgico, com um CI de 0,82 e um DRI associado de 2,45 para ambos os fármacos, a antagónico, com um CI de 1,71 (Tabela 5). Os valores de CI para os dois instantes temporais considerados são estatisticamente diferentes.



**Figura 22:** Curvas dose-resposta obtidas para o tratamento num regime de combinação sequencial de 5-fluorouracilo com olaparib, 48h e 24h (a) ou 72h e 48h (b), após a administração dos mesmos. Os resultados são expressos em percentagem do conteúdo proteico (média ± erro-padrão) normalizados ao controlo de, pelo menos, 3 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Tabela 21:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos 48h e 72h após a administração de 5-fluorouracilo e 24h e 48h após a de olaparib e do CI e DRI para cada fármaco, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

		IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	R <sup>2</sup>	CI	IC95%	DRI	IC95%
48h	5-FU	266,2	[52,1; 411,4]	0,94	0,82	[0,45; 1,18]	2,45	[0,75; 4,16]
24h	Olaparib	180,8	[35,4; 279,5]				2,45	[1,08; 3,83]
72h	5-FU	42,6	[31,5; 48,6]	0,90	1,71	[1,30; 2,12]	1,17	[0,66; 1,68]
48h	Olaparib	313,9	[232,4; 358,5]				1,17	[0,93; 1,40]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30

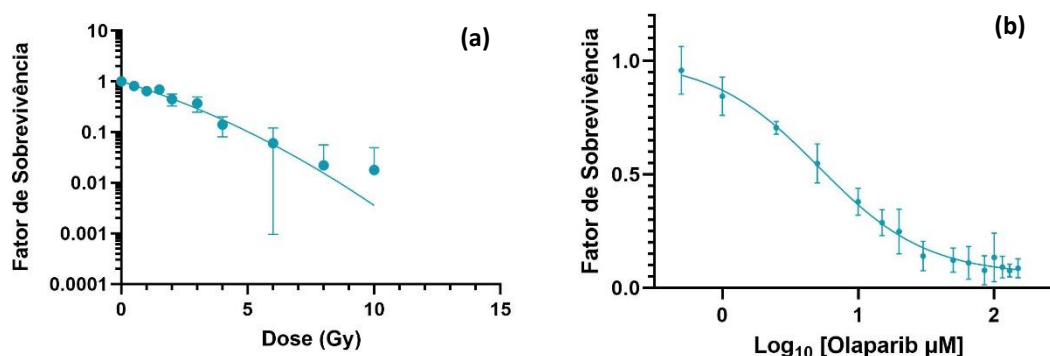
## 3.2. Avaliação da sobrevivência celular após tratamento com olaparib e radioterapia externa

### 3.2.1. Regime de monoterapia

Inicialmente, começou-se por avaliar a sobrevivência celular 12 dias após o tratamento com radioterapia ou olaparib, num regime de monoterapia, através do uso do ensaio clonogénico. Assim, o objetivo central desta secção foi a determinação do LD<sub>50</sub> para o tratamento com radioterapia externa e do IC<sub>50</sub> para o tratamento com olaparib (Tabela 22).

Na Figura 23 estão representadas as curvas de sobrevivência para os tratamentos referidos, que evidenciam o fator de sobrevivência das células em função da dose (a) e do logaritmo da concentração de olaparib (b). As curvas de sobrevivência permitem inferir que ocorreu uma

diminuição do fator de sobrevivência, que se verificou tanto com o aumento da dose, como com o aumento da concentração de olaparib. A curva (a) foi obtida através do modelo linear quadrático, uma vez que este, comparativamente ao modelo linear, demonstrou possuir um melhor ajuste aos resultados.



**Figura 23:** Curvas de sobrevivência obtidas após o tratamento, num regime de monoterapia, com radioterapia externa (a) ou olaparib (b). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média ± erro-padrão) em função da dose, em Gy (a) e em função do logaritmo da concentração utilizada, em µM (b), de pelo menos, 4 experiências em duplicado.

**Tabela 22:** Valor de IC<sub>50</sub> obtido após a administração isolada de olaparib, bem como o respectivos IC95% e R<sup>2</sup>, e valor de LD<sub>50</sub> obtido após tratamento com radioterapia externa, bem como o respectivos IC95% e R<sup>2</sup> e dos parâmetros que caracterizam o modelo linear quadrático.

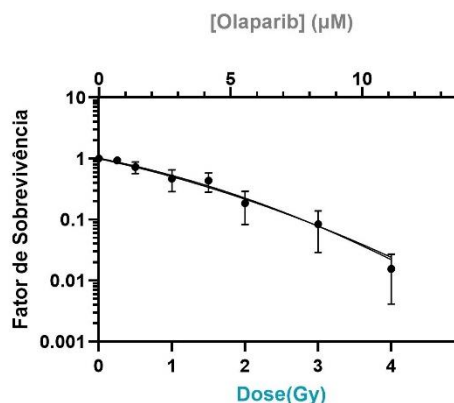
Olaparib			Radioterapia						
IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	R <sup>2</sup>	α (Gy <sup>-1</sup> )	IC95% α (Gy <sup>-1</sup> )	β (Gy <sup>-2</sup> )	IC95% β (Gy <sup>-2</sup> )	LD <sub>50</sub> (Gy)	IC95% LD <sub>50</sub> (Gy)	R <sup>2</sup>
5,17	[3,68; 6,53]	0,94	0,35	[0,30; 0,40]	0,02	[0,01; 0,04]	1,79	[1,67; 1,91]	0,96

### 3.2.2. Regime de combinação simultânea com uma concentração de olaparib variável

Em segundo lugar, avaliou-se a sobrevivência celular resultante da irradiação das células com consequente administração de olaparib com o objetivo de determinar o CI e o DRI da combinação, tendo para isso, também, por base os resultados obtidos na secção 3.2.1. Esta combinação foi, então, realizada a um rácio constante que corresponde à proporção entre IC<sub>50</sub> do olaparib e o valor de LD<sub>50</sub> para a radioterapia, ambos num regime de monoterapia.

Na Figura 24 encontra-se representada a curva de sobrevivência para a combinação simultânea de radioterapia com olaparib, obtida através do modelo linear quadrático, modelo

que melhor se ajustava aos resultados obtidos. O fator de sobrevivência está expresso em função da dose e da concentração de olaparib.



**Figura 24:** Curva de sobrevivência obtida após o tratamento, num regime de combinação simultânea, com radioterapia externa e olaparib. Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média ± erro-padrão) em função da dose, em Gy, e em função da concentração de fármaco utilizada, em µM, de 4 experiências independentes em duplicado.

Complementando este conjunto de resultados com os valores obtidos para o CI e DRI (Tabela 23), constata-se que este regime de combinação simultânea provocou uma diminuição significativa dos valores de IC50 e LD50, quando comparado com o regime de monoterapia de olaparib e da radioterapia (Anexo IV, Tabela 38). Ainda assim, o valor de CI obtido foi de 1,11, o que permitiu inferir que esta combinação possui um efeito ligeiramente antagónico (Tabela 5).

**Tabela 23:** Valores de IC<sub>50</sub> e LD<sub>50</sub> obtidos após a combinação de radioterapia com olaparib, do CI e DRI para cada forma de tratamento, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

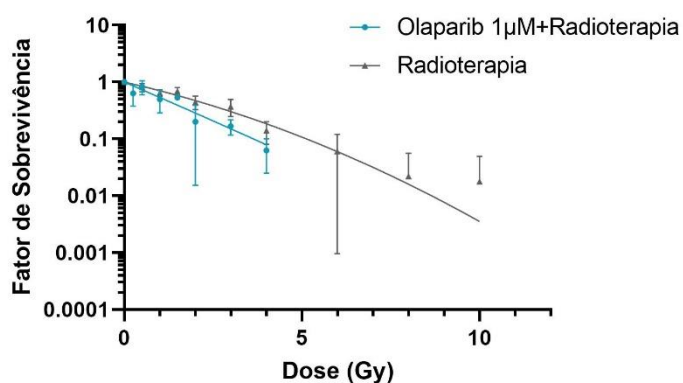
Olaparib		Radioterapia						Combinação				
IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	α (Gy <sup>-1</sup> )	IC95% α (Gy <sup>-1</sup> )	β (Gy <sup>-2</sup> )	IC95% β (Gy <sup>-2</sup> )	LD <sub>50</sub> (Gy)	IC95% LD <sub>50</sub> (Gy)	R <sup>2</sup>	CI	IC95% CI	DRI	IC95% DRI
2,83	[1,92; 3,59]	-	-	-	-	-	-	0,93	1,11	[0,89; 1,36]	1,82	[1,04; 2,62]
-	-	0,60	[0,47; 0,72]	0,08	[0,01; 0,17]	1,02	[0,92; 1,11]	0,92			1,76	[1,56; 1,96]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30

### 3.2.3. Regime de combinação simultânea com uma concentração fixa de olaparib

Para além da combinação em regime simultâneo descrita anteriormente, foi ainda testado outro modelo de combinação, em que a concentração de olaparib foi mantida constante ( $1 \mu\text{M}$ ). Segundo a literatura, a concentração referida não possui um efeito tóxico na linha celular MIA PaCa-2, permitindo, ainda, a inibição da atividade da proteína PARP-1<sup>71</sup>. O facto de  $1 \mu\text{M}$  de olaparib não possuir um efeito citotóxico por si só foi comprovado pelo gráfico presente na Figura 23 (b), uma vez que o fator de sobrevivência correspondente ao logaritmo desta concentração é de 0,87; com uma probabilidade de 95% do valor real para o fator de sobrevivência estar contido no intervalo [0,84; 0,90]. Assim, o objetivo desta secção consistiu na determinação do potencial radiosensibilizador do olaparib, de forma a aferir se uma concentração não citotóxica por si só, mas capaz de inibir a PARP, poderia potenciar a radioterapia.

A análise desta combinação foi feita em comparação à curva de sobrevivência obtida para a radioterapia em monoterapia. Ambas as curvas de sobrevivência estão representadas na Figura 25. Os valores de  $\text{LD}_{50}$ , os restantes parâmetros que caracterizam o modelo linear quadrático para cada caso, bem como os respetivos intervalos de confiança, e o valor SER calculado para a combinação encontram-se na Tabela 24.



**Figura 25:** Curva de sobrevivência para o tratamento com radioterapia em monoterapia, a cinzento, e para a combinação de radioterapia com  $1 \mu\text{M}$  de olaparib, a azul. Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média  $\pm$  erro-padrão) em função da dose, em Gy, de 4 experiências independentes em duplicado.

Através da análise dos valores de  $\text{LD}_{50}$  para ambos os casos e respetivos intervalos de confiança, presentes na Tabela 24, denota-se que com a administração de  $1 \mu\text{M}$  de olaparib há uma diminuição estatisticamente significativa dos valores referidos. O valor SER obtido para esta

combinação foi de 1,39; o que indica que a administração de 1  $\mu$ M de olaparib proporcionou um efeito radiosensibilizador que permitiu a redução de dose depositada em 1,39 vezes.

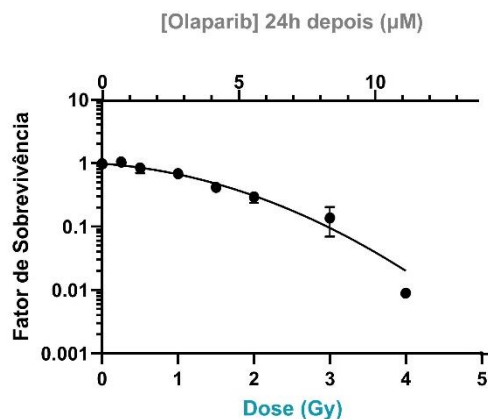
**Tabela 24:** Valor de LD<sub>50</sub> obtido após tratamento com radioterapia, tanto em monoterapia como em combinação com 1  $\mu$ M de olaparib, os respectivos IC95%, R<sup>2</sup>, os parâmetros que caracterizam o modelo linear quadrático e o SER para a combinação.

	$\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )	IC95% $\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )	$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )	IC95% $\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )	LD <sub>50</sub> (Gy)	IC95% LD <sub>50</sub> (Gy)	R <sup>2</sup>	SER	IC95% SER
<b>Radioterapia</b>	0,35	[0,30; 0,40]	0,02	[0,01; 0,04]	1,79	[1,67; 1,91]	0,96	-	-
<b>Radioterapia + 1 <math>\mu</math>M de Olaparib</b>	0,42	[0,20; 0,62]	0,09	[-0,01; 0,24]	1,29	[1,11; 1,47]	0,85	<b>1,39</b>	[1,17; 1,61]

### 3.2.4. Regime de combinação sequencial com uma concentração de olaparib variável

Por fim, foi testado o regime de combinação sequencial, em que o olaparib foi administrado 24h depois do processo de irradiação das células. Esta combinação foi realizada a um rácio constante, igual ao já descrito na secção 3.2.2.

Na Figura 26 encontra-se representada a curva de sobrevivência para a combinação sequencial de radioterapia com olaparib, sendo que o fator de sobrevivência está expresso em função da dose e da concentração de olaparib empregue. Através da análise da Tabela 25, verifica-se que esta combinação apenas provocou uma diminuição estatisticamente significativa do valor do LD50 para a radioterapia, quando comparado com o regime de monoterapia (Anexo IV, Tabela 38). A mesma possui um valor de CI de 1,50, o que faz com que o efeito observado seja classificado como antagónico (Tabela 5).



**Figura 26:** Curva de sobrevivência obtida após o tratamento, num regime de combinação sequencial, com radioterapia e olaparib (24h depois). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média ± erro-padrão) em função da dose, em Gy, e em função da concentração de fármaco utilizada, em µM, de 2 experiências independentes em duplicado.

**Tabela 25:** Valores de IC<sub>50</sub> e LD<sub>50</sub> obtidos após a combinação sequencial de radioterapia com olaparib, do CI e DRI para cada forma de tratamento, bem como dos respetivos IC95% e R<sup>2</sup>.

Olaparib		Radioterapia						Combinação				
IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	α (Gy <sup>-1</sup> )	IC95% α (Gy <sup>-1</sup> )	β (Gy <sup>-2</sup> )	IC95% β (Gy <sup>-2</sup> )	LD <sub>50</sub> (Gy)	IC95% LD <sub>50</sub> (Gy)	R <sup>2</sup>	CI	IC95% CI	DRI	IC95% DRI
3,57	[2,25; 4,55]	-	-	-	-	-	-	0,94	1,50	[1,16; 1,86]	1,45	[0,77; 2,12]
-	-	0,19	[-0,02; 0,39]	0,19	[0,08; 0,36]	1,45	[1,28; 1,64]	0,95			1,23	[1,06; 1,41]

**Classificação do Efeito**<sup>67</sup>: sinérgico: 0,3<CI<0,7; moderadamente sinérgico: 0,7<CI<0,85; ligeiramente sinérgico: 0,85<CI<0,90; praticamente aditivo: 0,90<CI<1,10; ligeiramente antagónico: 1,10<CI<1,20; moderadamente antagónico: 1,20<CI<1,45; antagónico: 1,45<CI<3,30



## **4. Discussão**



Apesar de não ser dos tipos de cancro com maior taxa de incidência a nível mundial, o cancro do pâncreas ocupa a sétima posição em termos de mortalidade, o que se justifica pelo seu crescimento local agressivo e pela disseminação metastática precoce<sup>11,12,72</sup>. No momento do diagnóstico, em 35% dos casos os doentes apresentam-se com PDAC localmente avançado e em 45% este já é classificado como metastático, culminando numa existência praticamente nula de opções terapêuticas potencialmente curativas<sup>13</sup>. A quimioterapia é a opção terapêutica mais usada para estes estádios da doença, quer seja a administração de gemcitabina em monoterapia ou combinada com nab-paclitaxel, quer seja o regime *FOLFIRINOX*. No entanto, estas opções proporcionam um baixo benefício aos doentes nas situações consideradas, por possuírem, em alguns casos, um elevado grau de toxicidade associado e pelo facto de se desenvolver resistência aos tratamentos por parte das células tumorais malignas<sup>18</sup>. Desta forma, torna-se de fulcral importância o surgimento de novas e eficazes abordagens de tratamento.

Nos últimos anos, a combinação de diferentes opções terapêuticas tem sido usada com a finalidade de ultrapassar as limitações dos tratamentos em regime de monoterapia provocadas, essencialmente, pela heterogeneidade tumoral e pela resistência das células tumorais a certos agentes quimioterapêuticos<sup>73</sup>. O principal objetivo da combinação de diferentes regimes terapêuticos é a obtenção de um efeito sinérgico, o que significa que o efeito da combinação é superior ao efeito aditivo que seria expectável após a administração desses mesmos regimes em monoterapia. Assim, o regime de combinação proporciona uma redução da dose de cada fármaco e, por conseguinte, uma redução do grau de toxicidade associado<sup>74</sup>.

Além das opções terapêuticas já mencionadas, existe ainda uma terapia dirigida, o olaparib aprovado desde 2019, para o tratamento do cancro do pâncreas metastático em doentes com mutações no gene *BRCA*, que tenham respondido positivamente a 16 semanas de quimioterapia com derivados da platina<sup>13</sup>. A base deste trabalho assenta na combinação do olaparib com DNA-DA ou radioterapia de fonte externa, de forma a determinar se alguma delas possui um efeito sinérgico, uma vez que se espera que estas combinações terapêuticas induzam uma sobrecarga de danos no DNA, que não vão, posteriormente, ser reparados devido à ação do iPARP.

Todas as combinações apresentadas foram avaliadas de acordo com o método estabelecido por *Chou e Talalay*<sup>65</sup>. Tendo como finalidade o cálculo do CI e DRI foi, então necessário obter as curvas dose-resposta e, conseqüentemente, os valores de  $IC_{50}$  para todos os fármacos em regime de monoterapia, para os três tempos de incubação considerados, e o  $LD_{50}$ , no caso da radioterapia.

Relativamente ao tratamento com olaparib ou DNA-DA, avaliado através do ensaio de SRB, foi possível constatar que todos os fármacos demonstraram possuir efeitos citotóxicos que dependeram da concentração a que as células foram expostas. No que diz respeito ao período

de incubação, o mesmo não se verificou para o olaparib, uma vez que não houve variações significativas nos valores de IC<sub>50</sub> deste, com o aumento do período de incubação. Em todos os restantes fármacos, quanto maior o período de incubação, maior os efeitos anti-proliferativos.

Após a avaliação dos fármacos isoladamente, procedeu-se à combinação do olaparib com gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina ou 5-fluorouracilo, quer através do regime de combinação simultânea quer do regime de combinação sequencial, com o olaparib que foi administrado 24h antes dos DNA-DA ou 24h depois. As combinações de fármacos são realizadas com o intuito de ultrapassar a resistência aos fármacos e de potenciar a atividade antitumoral, quando comparado com a utilização desses mesmos fármacos isoladamente<sup>75</sup>. Assim, os fármacos foram combinados com a finalidade de possuírem um efeito sinérgico que permitisse a redução da concentração de cada um dos fármacos na combinação, de modo a atingir o mesmo efeito terapêutico, com uma expectável diminuição da toxicidade<sup>75</sup>. Para além de tudo isto, o esquema de combinação tem, também, um papel bastante importante na eficácia de uma combinação, já que os mecanismos de ação dos fármacos são distintos e, por isso, pode ser benéfico combiná-los em diferentes regimes de concentração e tempo de incubação<sup>75</sup>.

No regime de combinação simultânea, o olaparib foi administrado ao mesmo tempo que os DNA-DA, tendo sido a concentração destes últimos estabelecida pela proporção entre os valores de IC<sub>50</sub> obtidos no regime de monoterapia. Os resultados obtidos para este regime permitiram aferir quais combinações possuíam um efeito sinérgico e para quais houve uma diminuição significativa dos valores de IC<sub>50</sub> dos fármacos em combinação.

As combinações simultâneas de olaparib com gemcitabina ou 5-fluorouracilo mostraram resultados semelhantes, no sentido em que o efeito obtido para as 24h foi classificado como moderadamente sinérgico (com um CI de 0,73 e 0,75, respetivamente)<sup>67</sup>. No entanto, com o aumento do período de incubação este efeito passou a ser praticamente aditivo (CI=1,05; para as 48h) e antagónico (CI=1,68; para as 72h) no caso da gemcitabina, e ligeiramente antagónico (CI de 1,15 e 1,18 para as 48h e 72h, respetivamente) no caso do 5-fluorouracilo<sup>67</sup>. Inicialmente, existe uma boa resposta por parte das células tumorais perante o tratamento com olaparib, que tem tendência a diminuir com o tempo, devido à aquisição de resistência a este tipo de tratamento por parte das células tumorais<sup>76</sup>. Isto pode dever-se a diversos fatores, nomeadamente mecanismos passíveis de reestruturarem a via de reparação por HR, a sobre expressão de proteínas de efluxo do fármaco que provoca a diminuição da sua concentração intracelular, ou a estabilização do garfo de replicação do DNA<sup>76</sup>. Este conjunto de resultados demonstra que o período de incubação de cada fármaco possui um papel fundamental na obtenção de um efeito sinérgico para a linha celular MiaPaCa-2. Um estudo conduzido por Jiang *et al.* em linhas celulares do cancro do pulmão obteve um efeito sinérgico para a combinação

simultânea de olaparib e de gemcitabina, contudo, neste caso, a avaliação do conteúdo proteico pelo ensaio de SRB foi realizada 5 dias após o tratamento com a combinação de fármacos, período de incubação bastante superior ao usado nos procedimentos descritos ao longo deste trabalho<sup>77</sup>.

Por outro lado, a combinação simultânea de olaparib com irinotecano exibiu um efeito moderadamente sinérgico independente do tempo de incubação, uma vez que os valores de CI (0,71; 0,77 e 0,72) não possuíram diferenças estatisticamente significativas entre si, com o aumento do período de incubação<sup>67</sup>. Com esta combinação houve uma diminuição estatisticamente significativa dos valores de IC<sub>50</sub> dos dois fármacos, quando comparada com o regime de monoterapia. Estes resultados podem justificar-se tendo em conta o mecanismo de ação tanto do olaparib, como do irinotecano. Este último inibe a ação das topoisomerases I, responsáveis pela reparação das SSB transitórias que ocorrem anteriormente ao processo de transcrição, o que leva à formação de SSB<sup>25,27</sup>. O olaparib por ser um iPARP atua, por um lado, no impedimento da reparação das SSB, através da inibição da via BER, e, por outro lado, no aprisionamento da PARP no local onde existe a SSB, o que culmina no colapso do garfo de replicação e na conversão de SSB não reparadas em DSB<sup>39,43</sup>. Ainda associado a esta combinação, o valor do DRI para cada período de incubação foi de 2,80 para ambos os fármacos às 24h, 2,61 no caso do olaparib e 2,60 no caso do irinotecano para as 48h e 2,77 para ambos os fármacos às 72h. Estes valores denotam o número de vezes que a concentração de cada fármaco diminui na combinação quando comparada com o regime em que cada fármaco é administrado de forma isolada.

Contrariamente à anterior, a combinação simultânea de olaparib com oxaliplatina demonstrou possuir um efeito que variou de antagónico (CI de 1,51 e 1,64 para as 24h e 48h) a moderadamente antagónico (CI de 1,37 para as 72h)<sup>67</sup>. O olaparib só se encontra aprovado para o tratamento do cancro do pâncreas metastático com mutações *BRCA*, para doentes que tenham respondido positivamente a tratamentos de 16 semanas com derivados da platina, como é o caso da oxaliplatina. Esta aprovação foi feita a partir de resultados obtidos em ensaios clínicos, pelo que tem uma base empírica e não científica. Isto deve-se ao facto dos tumores com mutações *BRCA* exibirem um elevado nível de sensibilidade a certos DNA-DA, como é o caso dos inibidores das topoisomerases e de alguns agentes alquilantes, o que provoca um elevado nível de danos no DNA<sup>76</sup>. Assim, é de extrema importância avaliar a combinação de olaparib com oxaliplatina no regime sequencial, de forma a comprovar o que se encontra postulado na literatura.

Um estudo realizado por *Vitiello et al.* em linhas celulares de cancro do cólon, nas quais foi empregue um regime de combinação simultânea de um iPARP, o niraparib, com três DNA-DA

(oxaliplatina, 5-fluorouracilo ou SN-38, metabolito ativo do irinotecano), demonstrou a existência de um efeito sinérgico de maior grau para a combinação de niraparib com o SN-38, enquanto que para a combinação de niraparib com os outros dois DNA-DA os efeitos obtidos detiveram um certo grau de antagonismo, o que se encontra em linha com os resultados obtidos ao longo deste trabalho, no regime de combinações simultâneas<sup>78</sup>.

No conjunto de combinações sequenciais em que o olaparib foi administrado 24h antes dos DNA-DA, o primeiro fármaco teve um período de incubação de 48h e 72h, enquanto que no caso do segundo esse período passou a ser de 24h e 48h. A administração de olaparib 24h depois dos DNA-DA implicou a realização do ensaio de SRB 24h e 48h da adição do iPARP, sendo o período de incubação dos DNA-DA de 48h e 72h.

De uma forma semelhante, os resultados das combinações sequenciais de olaparib 24h antes da oxaliplatina ou do 5-fluorouracilo denotam a obtenção de um efeito moderadamente antagónico para o primeiro caso e um efeito antagónico para o segundo, que, em ambos os casos, foi independente do período de incubação, sendo que apenas houve uma diminuição significativa dos valores de  $IC_{50}$  48h após a administração de olaparib<sup>67</sup>. Desta forma, estas duas combinações com períodos de incubação de 72h/48h aparentam não proporcionar qualquer tipo de benefício enquanto opção de tratamento para o cancro do pâncreas.

Quando a adição de olaparib se dá 24h depois da oxaliplatina, os efeitos variam entre praticamente aditivo (CI de 0,99 para as 24h/48h) e ligeiramente sinérgico (CI de 0,86 para as 48h/72h), sendo estes dependentes do tempo de incubação<sup>67</sup>. Este conjunto de resultados encontra-se em concordância com o racional que levou à aprovação do olaparib para o tratamento do cancro do pâncreas, nas condições já especificadas. Isto pode ser explicado tendo por base os mecanismos de ação dos dois fármacos. A oxaliplatina ao ser um agente alquilante forma ligações cruzadas com o DNA, o que impede o processo de transcrição, levando ao colapso do garfo de replicação e à formação de SSB ou DSB<sup>28</sup>. A combinação da oxaliplatina com o olaparib, que impede a reparação das SSB e provoca, também, o colapso do garfo de replicação, concretiza-se numa sobrecarga de danos no DNA que não são passíveis de serem reparados, o que culmina num elevado nível de morte celular. Denota-se que a administração em primeiro lugar da oxaliplatina e o maior tempo de incubação dos fármacos são os pontos fundamentais para a obtenção do efeito sinérgico, sendo o regime mais vantajoso de combinação destes dois fármacos.

A administração de olaparib 24h depois do 5-fluorouracilo possuiu um efeito ligeiramente sinérgico (CI=0,82) que, com o aumento do tempo de incubação, passa a ser classificado como antagónico (CI=1,71)<sup>67</sup>. Mais uma vez estes resultados podem ser justificados pelo facto de as células tumorais apresentarem uma boa resposta inicial ao tratamento com olaparib, sendo que

esta tem tendência a diminuir com o tempo, devido à aquisição de resistência a este tipo de tratamento<sup>76</sup>.

A combinação de olaparib 24h antes da gemcitabina proporcionou um efeito que passou de ligeiramente antagónico (CI=1,18) a praticamente aditivo (CI=1,06), enquanto que quando o olaparib foi administrado 24h depois o efeito começou por ser moderadamente antagónico (CI=1,22) tornando-se antagónico (CI=2,31), com o aumento do período de incubação<sup>67</sup>. Através da análise destes resultados, constata-se que combinar gemcitabina, fármaco que provoca a inibição da replicação do DNA durante a fase S do ciclo celular, e olaparib não permite a obtenção de um efeito sinérgico em nenhum dos regimes de combinação sequencial avaliados. As SSB não reparadas que se originam devido à ação do olaparib dão origem a DSB, a forma mais letal de danos no DNA, durante o processo de replicação do DNA<sup>76</sup>. A ação da gemcitabina pode impedir, de certa forma, a formação de DSB, o que pode explicar em parte os efeitos obtidos para as combinações.

À semelhança do que se verificou com a combinação simultânea de olaparib com irinotecano, também nos regimes de combinação sequencial foram obtidos valores de CI inferiores a 1. A administração de olaparib 24h antes do irinotecano obteve um efeito praticamente aditivo para as 48h/24h (CI=0,91) e um ligeiramente sinérgico para as 72h/48h (CI=0,72)<sup>67</sup>. No caso de o olaparib ser administrado 24h depois denota-se a existência de um efeito sinérgico mais pronunciado e independente do tempo de incubação (CI de 0,61 e 0,68 para as 24h/48h e 48h/72h, respetivamente)<sup>67</sup>. Este último regime foi o que demonstrou um resultado mais benéfico, mesmo quando comparado com a administração simultânea dos dois fármacos, o que pode ser explicado pela indução de SSB durante 24h, o que causa uma sobrecarga nas vias de reparação, sendo este efeito exacerbado pela consequente inibição dessas mesmas vias de reparação, culminando na morte celular. Ainda assim, o irinotecano é convertido no SN-38, metabolito 1000 vezes mais ativo, pela ação das carboxilesterases, que apesar de estarem presentes na maioria dos tecidos possuem um maior grau de expressão no epitélio de órgãos metabólicos, como é o caso do fígado, intestino delgado e rim<sup>79</sup>. O pâncreas, órgão produtor de enzimas digestivas e de hormonas, possui uma expressão de carboxilesterases inferiores aos órgãos metabólicos referidos<sup>79</sup>. Uma vez que a avaliação destas combinações *in vitro* foi feita numa linha celular representativa de PDAC, pode não ter sido explorado todo o potencial deste conjunto de combinações, perspetivando-se que os resultados *in vivo* possam vir a ser bastante melhores.

A combinação de olaparib com radioterapia de fonte externa foi outra abordagem estudada ao longo da realização deste trabalho, o que implicou a avaliação da sobrevivência celular pelo ensaio clonogénico. Primeiramente, avaliaram-se os regimes de monoterapia, obtendo-se os

valores de  $IC_{50} = 5,17 \mu\text{M}$  para o olaparib e  $LD_{50} = 1,79 \text{ Gy}$  para a radioterapia de fonte externa, de forma a estabelecer a gama de concentrações de olaparib e dose de radiação a serem utilizadas no regime de combinação.

A combinação destas duas opções terapêuticas foi realizada recorrendo a três abordagens distintas: combinação simultânea de olaparib e radioterapia à proporção de  $IC_{50}/LD_{50}$ , combinação simultânea de  $1 \mu\text{M}$  de olaparib com radioterapia e combinação sequencial de olaparib e radioterapia à proporção de  $IC_{50}/LD_{50}$ , com o olaparib a ser administrado 24h depois da irradiação.

As combinações simultânea e sequencial com uma concentração variável de olaparib foram avaliadas pelo método estabelecido por *Chou e Talalay*<sup>65</sup>. Os valores do CI obtidos denotam que para o primeiro caso a combinação proporcionou um efeito ligeiramente antagónico (CI=1,11) e no segundo caso estamos perante um efeito antagónico (CI=1,50)<sup>67</sup>. Na literatura existem estudos que procedem à combinação de olaparib com radioterapia, contudo, a avaliação da mesma é feita de forma diferente, o que impossibilita a comparação direta dos valores obtidos. Ainda assim, a combinação simultânea providencia uma redução de 1,82 vezes na concentração de olaparib e de 1,76 vezes na dose de radiação, quando comparada com o regime de monoterapia para cada um dos tratamentos. Contrariamente aos efeitos dos DNA-DA, os efeitos da radioterapia poderão ser observados apenas mais tardiamente, pelo que a irradiação em regime sequencial com a administração de olaparib poderá ser mais eficaz na produção de um efeito sinérgico<sup>56,71</sup>.

Apesar da combinação de olaparib com radioterapia não ter demonstrado possuir um efeito sinérgico, foi possível concluir que a administração deste iPARP pode ter um efeito importante na radiosensibilização das células, potenciando o efeito da radioterapia. Este facto é comprovado pelos resultados obtidos para o valor SER calculado para a avaliação da combinação de  $1 \mu\text{M}$  de Olaparib com radioterapia. A administração desta concentração de iPARP, não citotóxica por si só, proporcionou um efeito radiosensibilizador que permitiu a redução da dose em 1,39 vezes, quando comparada com o regime de monoterapia.

Num estudo semelhante ao realizado, com doses entre os 0 e 10 Gy e uma concentração de  $1 \mu\text{M}$  de olaparib, o valor SER descrito foi de 1,24, tendo sido, no entanto, calculado de forma diferente.<sup>71</sup> Com os resultados obtidos nas curvas de sobrevivência da radioterapia em monoterapia e da combinação da radioterapia com olaparib a uma concentração fixa calculou-se o valor SER (neste caso foi de 1,56), através do quociente das doses correspondentes a um fator de sobrevivência de 0,1 entre o primeiro caso e o segundo, por forma a estabelecer uma comparação direta com o valor obtido por *Waissi et al*<sup>71</sup>. Assim, é possível concluir que os



resultados se encontram em concordância, uma vez que o valor obtido na literatura está contido no intervalo de confiança obtido para este parâmetro ([1,20; 1,91]).

Da mesma forma que as combinações de radioterapia e olaparib com uma concentração variável foram avaliadas num regime simultâneo e sequencial, também seria importante estudar o efeito radiosensibilizador do olaparib com uma concentração fixa num esquema temporal diferente, com a finalidade de aferir se o nível de sensibilização das células à radioterapia poderia vir a ser superior.



## **5. Conclusão e Perspetivas Futuras**



Dado o paradigma atual de incidência e mortalidade do cancro do pâncreas associado ao seu diagnóstico complexo e tardio, torna-se de extrema importância encontrar novas e eficazes abordagens terapêuticas, capazes de aumentar, assim, a sobrevivência geral associada a esta doença.

O principal objetivo deste trabalho experimental foi avaliar o potencial terapêutico da combinação de olaparib com DNA-DA ou radioterapia na linha celular MIA PaCa-2, representativa de PDAC. O efeito sinérgico da combinação do iPARP com os DNA-DA foi avaliado em diferentes regimes que contemplaram a combinação simultânea e a combinação sequencial, com a administração do olaparib 24h antes dos DNA-DA ou 24h depois. Foram usados três regimes de combinação diferentes de modo a tentar colmatar as limitações da associação de fármacos com mecanismos de ação distintos. No caso da combinação de olaparib com radioterapia foi avaliado o efeito sinérgico, num regime de concomitância e sequencial, com o iPARP a ser administrado 24h depois da irradiação. Por fim, foi também avaliado o efeito radiosensibilizador do iPARP, através da sua combinação simultânea, com radioterapia, a uma concentração fixa e não citotóxica.

É possível constatar que a combinação de irinotecano com olaparib demonstrou um efeito sinérgico na linha celular MIA PaCa-2, nomeadamente no regime de combinação simultânea e sequencial em que o olaparib foi adicionado 24h depois, o que permite concluir que a combinação de olaparib com irinotecano demonstrou ser a mais promissora entre as combinações com DNA-DA avaliadas ao longo deste projeto. Para além desta, também a combinação em que o olaparib é administrado 24h depois da oxaliplatina, com um período de incubação de 48h e 72h, respetivamente, demonstrou possuir um efeito ligeiramente sinérgico, resultados esses que sustentam o regime para o qual o olaparib já se encontra aprovado para o tratamento do cancro do pâncreas.

O facto de não terem sido obtidos efeitos sinérgicos para as restantes combinações pode indicar a necessidade de se usarem novas proporções nas concentrações dos fármacos, em que cada um contribua de forma diferente para a combinação, bem como de se utilizarem diferentes esquemas de combinações, entre as quais se sugere a administração de olaparib 48h antes ou depois dos DNA-DA. Para além disso, pode, também, ser importante avaliar a combinação, nos diferentes regimes já considerados, de olaparib com SN-38, o metabolito ativo do irinotecano, de forma a depreender se poderá ser obtido um efeito sinérgico ainda mais pronunciado.

A combinação de olaparib com radioterapia, contrariamente ao inicialmente esperado, não permitiu a obtenção de um efeito sinérgico para nenhum dos regimes de combinação considerados. Contudo, foi possível concluir que o olaparib possui um efeito radiosensibilizador

na linha celular MIA PaCa-2, permitindo, pelo menos, uma redução da dose de radioterapia na combinação, quando comparada com o regime de monoterapia.

Como perspetivas futuras adicionais, destacam-se não só a necessidade de avaliar todos os regimes de combinação apresentados noutras linhas celulares representativas de cancro do pâncreas, nomeadamente na PANC-1 e HS766T, como também a necessidade de estudar os efeitos das combinações mais promissoras numa linha celular normal do pâncreas, de modo a aferir o nível de toxicidade associado. Para além disso, é, ainda, importante determinar os efeitos das combinações mais promissoras em diferentes níveis como é o caso da viabilidade, perfil de morte celular e ciclo celular, através da citometria de fluxo, e o tipo de danos no DNA, por exemplo através do ensaio cometa. Este tipo de avaliação juntamente com a avaliação das possíveis interações farmacocinéticas das combinações permitirá uma compreensão mais detalhada do potencial de cada combinação, de modo a complementar os resultados obtidos até então.

Em suma, este trabalho evidenciou que a combinação do olaparib com outras opções terapêuticas poderá ser uma abordagem válida e eficaz para o tratamento do cancro do pâncreas, constituindo-se como uma alternativa às poucas opções existentes até então na prática clínica.

## **6. Bibliografia**





1. National Cancer Institute. What Is Cancer? - NCI. Published October 11, 2021. Accessed March 13, 2023. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. Rad A. Pancreas: Anatomy, functions, blood supply, innervation | Kenhub. Published July 22, 2022. Accessed February 14, 2023. <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-pancreas>
3. Preisler S. Where is Your Pancreas Located and What It Does. Published March 17, 2021. Accessed March 8, 2023. <https://ezra.com/blog/the-pancreas-anatomy-and-functions>
4. Johns Hopkins University. Pancreas Basics - Pancreatic Cancer. Published 2023. Accessed February 22, 2023. <https://pathology.jhu.edu/pancreas/basics>
5. Yuan Q, Pan A, Fu Y, Dai Y. Anatomy and physiology of the pancreas. *Integrative Pancreatic Intervention Therapy: A Holistic Approach*. Published online January 1, 2020:3-21. doi:10.1016/B978-0-12-819402-7.00001-2
6. Biga LM, Bronson S, Dawson S, et al. 17.9 The Pancreas. Published online September 26, 2019. Accessed February 22, 2023. <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/17-9-the-pancreas/>
7. Orth M, Metzger P, Gerum S, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiation Oncology* 2019 14:1. 2019;14(1):1-20. doi:10.1186/S13014-019-1345-6
8. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019;10(1):10. doi:10.14740/WJON1166
9. Lippi G, Mattiuzzi C. The global burden of pancreatic cancer. *Archives of Medical Science*. 2020;16(4):820-824. doi:10.5114/AOMS.2020.94845
10. Nguyen HQ, Pham NTT, Hoang VT, Van HAT, Huynh C, Hoang DT. Diffuse Pancreatic Carcinoma with Hepatic Metastases. Cives M, ed. *Case Rep Oncol Med*. 2020;2020:1-5. doi:10.1155/2020/8815745
11. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/CAAC.21660
12. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;149(4):778-789. doi:10.1002/IJC.33588
13. Bazeed AY, Day CM, Garg S. Pancreatic Cancer: Challenges and Opportunities in Locoregional Therapies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17). doi:10.3390/CANCERS14174257
14. WCRF International. Pancreatic cancer statistics. Accessed February 27, 2023. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/pancreatic-cancer-statistics/>
15. Capasso M, Franceschi M, Rodriguez-Castro KI, et al. Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*. 2018;89(Suppl 9):141. doi:10.23750/ABM.V89I9-S.7923
16. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Pancreatic Cancer: Diagnosis | Cancer.Net. Published July 2022. Accessed April 27, 2023. <https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/diagnosis>

17. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015;26:v56-v68. doi:10.1093/annonc/mdv295
18. Zhu H, Wei M, Xu J, et al. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*. 2020;19(1):49. doi:10.1186/s12943-020-01167-9
19. American Cancer Society. Pancreatic Cancer Stages. Published February 11, 2019. Accessed May 4, 2023. <https://www.cancer.org/cancer/types/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
20. American Cancer Society. Treating Pancreatic Cancer, Based on Extent of the Cancer. Published January 2, 2020. Accessed May 8, 2023. <https://www.cancer.org/cancer/types/pancreatic-cancer/treating/by-stage.html>
21. ESMO Guidelines Committee. Cancer of the pancreas treatment recommendations. Published March 15, 2019. Accessed May 13, 2023. <https://www.esmo.org/guidelines/guidelines-by-topic/gastrointestinal-cancers/pancreatic-cancer/eupdate-cancer-of-the-pancreas-treatment-recommendations>
22. Trimble EL, Ungerleider RS, Abrams JA, et al. Neoadjuvant therapy in cancer treatment. *Cancer*. 1993;72(11 Suppl):3515-3524. doi:10.1002/1097-0142(19931201)72:11+<3515::aid-cnrc2820721619>3.0.co;2-a
23. Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol*. 2013;20(5):648-659. doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.007
24. de Almeida LC, Calil FA, Machado-Neto JA, Costa-Lotufo LV. DNA damaging agents and DNA repair: From carcinogenesis to cancer therapy. *Cancer Genet*. 2021;252-253:6-24. doi:10.1016/j.cancergen.2020.12.002
25. Weber GF. DNA Damaging Drugs. In: *Molecular Therapies of Cancer*. Springer International Publishing; 2015:9-112. doi:10.1007/978-3-319-13278-5\_2
26. Shields M. Chemotherapeutics. In: *Pharmacognosy*. Elsevier; 2017:295-313. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00014-7
27. Rose M, Burgess JT, O'byrne K, Richard DJ, Bolderson E. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. Published online 2020. doi:10.3389/fcell.2020.564601
28. Dréan A, Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitor combination therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;108:73-85. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.10.010
29. Schjesvold F, Oriol A. Current and Novel Alkylators in Multiple Myeloma. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 2465. 2021;13(10):2465. doi:10.3390/CANCERS13102465
30. Azarenko O, Smiyun G, Mah J, Wilson L, Jordan MA. Antiproliferative Mechanism of Action of the Novel Taxane Cabazitaxel as Compared with the Parent Compound Docetaxel in MCF7 Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(8):2092-2103. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0265
31. Infomed. Gemcitabina Aurovitas. Accessed July 16, 2023. <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

32. Hawryłkiewicz A, Ptaczyńska N. Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 364. 2021;26(2):364. doi:10.3390/MOLECULES26020364
33. Kciuk M, Marciniak B, Kontek R. Irinotecan—Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 4919. 2020;21(14):4919. doi:10.3390/IJMS21144919
34. Infomed. Oxaliplatina Accord. Accessed July 17, 2023. <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
35. Nichetti F, Falvella FS, Miceli R, et al. Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients? *The Pharmacogenomics Journal* 2019 19:5. 2019;19(5):465-472. doi:10.1038/s41397-019-0078-0
36. Infomed. Detalhes do Medicamento: Fluorouracilo Hikma. Accessed July 17, 2023. <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
37. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*. 2008;13(8):1551-1569. doi:10.3390/molecules13081551
38. Kanno Y, Chen CY, Lee HL, Chiou JF, Chen YJ. Molecular Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Head and Neck Cancers. *Front Oncol*. 2021;11:640392. doi:10.3389/FONC.2021.640392/BIBTEX
39. Branco C, Paredes J. Inibidores da PARP: do mecanismo de ação à prática clínica. *Acta Med Port*. 2022;35(2):135-143. doi:10.20344/amp.13870
40. Topatana W, Juengpanich S, Li S, et al. Advances in synthetic lethality for cancer therapy: Cellular mechanism and clinical translation. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):1-22. doi:10.1186/s13045-020-00956-5
41. Desai D, Khandwala P, Parsi M, Potdar R. PARP inhibitors: shifting the paradigm in the treatment of pancreatic cancer. *Medical Oncology*. 2021;38(6):61. doi:10.1007/s12032-021-01507-9
42. Jurkovicova D, Neophytou CM, Gašparović AČ, Gonçalves AC. DNA Damage Response in Cancer Therapy and Resistance: Challenges and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 14672. 2022;23(23):14672. doi:10.3390/IJMS232314672
43. Gogola E, Rottenberg S, Jonkers J. Resistance to PARP Inhibitors: Lessons from Preclinical Models of BRCA-Associated Cancer. *Annu Rev Cancer Biol*. 2019;3(1):235-254. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030617-050232
44. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol*. 2015;137(2):343-350. doi:10.1016/J.YGYNO.2015.02.017
45. Mateo J, Lord CJ, Serra V, et al. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of Oncology*. 2019;30(9):1437-1447. doi:10.1093/annonc/mdz192
46. Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation . *New England Journal of Medicine*. 2017;377(6):523-533. doi:10.1056/NEJMOA1706450/SUPPL\_FILE/NEJMOA1706450\_DISCLOSURES.PDF

47. Jaffray DA, Gospodarowicz MK. Radiation Therapy for Cancer. In: *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3): Cancer*. Vol 6. The World Bank; 2015:239-247. doi:10.1596/978-1-4648-0349-9\_ch14
48. Joiner MC, van der Kogel AJ, eds. *Basic Clinical Radiobiology*. CRC Press; 2018. doi:10.1201/9780429490606
49. Kirthi Koushik AS, Harish K, Avinash HU. Principles of Radiation Oncology: A Beams Eye View for a Surgeon. *Indian J Surg Oncol*. 2013;4(3):255-262. doi:10.1007/s13193-013-0231-1
50. Chang DS, Lasley FD, Das IJ, Mendonca MS, Dynlacht JR. *Basic Radiotherapy Physics and Biology*. Springer International Publishing; 2021. doi:10.1007/978-3-030-61899-5
51. American Cancer Society. The Science Behind Radiation Therapy. Published online 2014.
52. TrueBeam | Varian. Accessed July 2, 2023. <https://www.varian.com/pt-pt/products/radiotherapy/treatment-delivery/truebeam>
53. Carlos-Reyes A, Muñiz-Lino MA, Romero-Garcia S, López-Camarillo C, Hernández-de la Cruz ON. Biological Adaptations of Tumor Cells to Radiation Therapy. *Front Oncol*. 2021;11:718636. doi:10.3389/FONC.2021.718636/BIBTEX
54. Sharda N, Yang CR, Kinsella T, Boothman D. Radiation Resistance. In: *Encyclopedia of Cancer*. Elsevier; 2002:1-11. doi:10.1016/B0-12-227555-1/00519-0
55. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(4):928-942. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.03.005
56. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci*. 2012;9(3):193-199. doi:10.7150/ijms.3635
57. Sia J, Szmyd R, Hau E, Gee HE. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:512111. doi:10.3389/FCELL.2020.00041/BIBTEX
58. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier; 2017:151-172. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
59. Introduction to Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - PT. Accessed July 20, 2023. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
60. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer*. 1977;19(1):128-135. doi:10.1002/IJC.2910190118
61. Gradiz R, Silva HC, Carvalho L, Botelho MF, Mota-Pinto A. MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/SREP21648
62. MIA PaCa-2 - CRL-1420 | ATCC. Accessed July 23, 2023. <https://www.atcc.org/products/crl-1420>
63. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived

- compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007;42(4):377-387. doi:10.1016/J.YMETH.2007.01.003
64. Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. Published online January 1, 2017:271-297. doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8
65. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22(C):27-55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4
66. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the choutalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947/655517/P/DRUG-COMBINATION-STUDIES-AND-THEIR-SYNERGY
67. Chou TC, Martin N. CompuSyn For Drug Combinations User's Guide A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug CompuSyn for Drug Combinations COMPUSYN SOFTWARE LICENSE AGREEMENT. Published online 2004.
68. Mahdavi BF, Taheri A, Hejazi SH, Talebi A, Shokrani P. A protocol for irradiation of cell lines cultured in multi-well plates: effect of air inhomogeneity on irradiated cell survival. <https://doi.org/10.1080/0955300220191642541>. 2019;95(11):1543-1546. doi:10.1080/09553002.2019.1642541
69. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 2006 1:5. 2006;1(5):2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
70. Bright SJ, Flint DB, Martinus DKJ, et al. Targeted Inhibition of DNA-PKcs, ATM, ATR, PARP, and Rad51 Modulate Response to X Rays and Protons. *Radiat Res*. 2022;198(4):336-346. doi:10.1667/RADE-22-00040.1
71. Waissi W, Amé JC, Mura C, Noël G, Burckel H. Gemcitabine-Based Chemoradiotherapy Enhanced by a PARP Inhibitor in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13). doi:10.3390/IJMS22136825
72. Kolbeinsson HM, Chandana S, Wright GP, Chung M. Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *Journal of Investigative Surgery*. 2023;36(1). doi:10.1080/08941939.2022.2129884
73. Qin SY, Cheng YJ, Lei Q, Zhang AQ, Zhang XZ. Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy. *Biomaterials*. 2018;171:178-197. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.04.027
74. Duarte D, Vale N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2022;3:100110. doi:10.1016/J.CRPBAR.2022.100110
75. Vogus DR, Pusuluri A, Chen R, Mitragotri S, Samir Mitragotri C, Paulson JA. Schedule dependent synergy of gemcitabine and doxorubicin: Improvement of in vitro efficacy and lack of in vitro-in vivo correlation. *Bioeng Transl Med*. 2018;3(1):49-57. doi:10.1002/BTM2.10082

76. Dias MP, Moser SC, Ganesan S, Jonkers J. Understanding and overcoming resistance to PARP inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021 18:12. 2021;18(12):773-791. doi:10.1038/s41571-021-00532-x
77. Jiang Y, Dai H, Li Y, et al. PARP inhibitors synergize with gemcitabine by potentiating DNA damage in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2019;144(5):1092-1103. doi:10.1002/ijc.31770
78. Vitiello PP, Martini G, Mele L, et al. Vulnerability to low-dose combination of irinotecan and niraparib in ATM-mutated colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2021;40(1):15. doi:10.1186/s13046-020-01811-8
79. Wang D, Zou L, Jin Q, Hou J, Ge G, Yang L. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(5):699-712. doi:10.1016/J.APSB.2018.05.005

## **7. Anexos**





## Anexo I

**Tabela 26:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e gemcitabina, bem como após a sua combinação simultânea.

		Monoterapia		Combinação simultânea	
		IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	162,1	[141,3; 186,6]
	Gemcitabina	19046	[16378; 20390]	6959	[6067; 8008]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	191,9	[164,4; 226,6]
	Gemcitabina	9574	[7352; 11367]	5015	[4297; 5922]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	364,9	[304,5; 586,9]
	Gemcitabina	0,0035	[0,0030; 0,0041]	0,0030	[0,0025; 0,0048]

**Tabela 27:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e irinotecano, bem como após a sua combinação simultânea.

		Monoterapia		Combinação simultânea	
		IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	158,4	[141,6; 177,9]
	Irinotecano	215,8	[180,9; 269,2]	77,1	[68,9; 86,5]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	140,6	[124,1; 159,9]
	Irinotecano	57,8	[46,4; 74,5]	22,2	[19,6; 25,2]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	156,6	[123,6; 211,9]
	Irinotecano	11,8	[10,2; 13,6]	4,3	[3,4; 5,8]

**Tabela 28:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e oxaliplatina, bem como após a sua combinação simultânea.

		Monoterapia		Combinação simultânea	
		IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC95% (µM)
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	334,0	[297,1; 379,2]
	Oxaliplatina	61,8	[54,4; 70,7]	46,5	[41,4; 52,8]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	299,9	[267,7; 345,0]
	Oxaliplatina	41,9	[36,8; 47,8]	34,3	[30,7; 39,5]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	298,1	[241,4; 487,3]
	Oxaliplatina	8,3	[6,8; 10,6]	5,8	[4,7; 9,5]

**Tabela 29:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 24h, 48h e 72h após a administração isolada de olaparib e 5-fluorouracilo, bem como após a sua combinação simultânea.

		Monoterapia		Combinação simultânea	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	116,2	[141,1; 198,5]
	5-FU	64440	[58324; 70781]	24136	[20491; 28827]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	209,8	[136,1; 311,3]
	5-FU	653,2	[371,1; 1385,0]	374,1	[242,6; 555,2]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	256,0	[210,7; 354,2]
	5-FU	49,7	[35,1; 67,0]	29,3	[24,1; 40,5]

## Anexo II

**Tabela 30:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de gemcitabina, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	215,4	[187,5; 248,8]
24h	Gemcitabina	19046	[16378; 20390]	11200	[9750; 12939]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	230,2	[136,1; 311,3]
48h	Gemcitabina	9574	[7352; 11367]	5078	[4255; 6641]

**Tabela 31:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de irinotecano, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	166,1	[142,9; 196,1]
24h	Irinotecano	215,8	[180,9; 269,2]	97,9	[84,2; 115,5]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	155,6	[127,9; 198,1]
48h	Irinotecano	57,8	[46,4; 74,5]	20,7	[17,0; 26,4]

**Tabela 32:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de oxaliplatina, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	253,8	[216,4; 315,1]
24h	Oxaliplatina	61,8	[54,4; 70,7]	42,8	[36,5; 53,2]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	262,0	[202,0; 498,2]
48h	Oxaliplatina	41,9	[36,8; 47,8]	25,3	[19,5; 48,2]

**Tabela 33:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração do olaparib e 24h e 48h após a de 5-fluorouracilo, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	282,7	[258,1; 312,5]
24h	5-FU	64440	[58324; 70781]	49732	[45397; 54978]
72h	Olaparib	433,9	[390,7; 486,4]	322,1	[217,1; 1830]
48h	5-FU	653,2	[371,1; 1385,0]	484,9	[326,9; 2755]

### Anexo III

**Tabela 34:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de gemcitabina e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Gemcitabina	9574	[7352; 11367]	5833	[3744; 7223]
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	270,3	[173,5; 334,7]
72h	Gemcitabina	0,0035	[0,0030; 0,0041]	0,0041	[0,0035; 0,0057]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	423,3	[360,7; 597,7]

**Tabela 35:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de irinotecano e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Irinotecano	57,8	[46,4; 74,5]	17,5	[14,3; 21,9]
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	134,7	[110,4; 168,4]
72h	Irinotecano	11,8	[10,2; 13,6]	4,0	[3,0; 5,7]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	123,9	[92,2; 177,4]

**Tabela 36:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de oxaliplatina e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
48h	Oxaliplatina	41,9	[36,8; 47,8]	20,9	[17,5; 26,8]
24h	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	220,6	[184,8; 283,5]
72h	Oxaliplatina	8,3	[6,8; 10,6]	3,6	[2,1; 5,1]
48h	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	157,1	[92,5; 220,5]

**Tabela 37:** Valores de IC<sub>50</sub> e respectivos IC95% obtidos 48h e 72h após a administração de 5-fluorouracilo e 24h e 48h após a de olaparib, em monoterapia ou num regime de combinação sequencial.

		Monoterapia		Combinação sequencial	
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)
<b>48h</b>	5-FU	653,2	[371,1; 1385,0]	266,2	[52,1; 411,4]
<b>24h</b>	Olaparib	443,7	[395,9; 501,6]	180,8	[35,4; 279,5]
<b>72h</b>	5-FU	49,7	[35,1; 67,0]	42,6	[31,5; 48,6]
<b>48h</b>	Olaparib	366,3	[324,3; 417,6]	313,9	[232,4; 358,5]

## Anexo IV

**Tabela 38:** Valores de IC<sub>50</sub> e LD<sub>50</sub> obtidos após o regime de monoterapia de olaparib ou radioterapia de fonte externa, e após a sua combinação simultânea ou sequencial, bem como dos respectivos IC95%.

	Olaparib		Radioterapia					
	IC <sub>50</sub> (μM)	IC95% (μM)	α (Gy <sup>-1</sup> )	IC95% α (Gy <sup>-1</sup> )	β (Gy <sup>-2</sup> )	IC95% β (Gy <sup>-2</sup> )	LD <sub>50</sub> (Gy)	IC95% LD <sub>50</sub> (Gy)
<b>Monoterapia</b>	5,17	[3,68; 6,53]	0,35	[0,30; 0,40]	0,02	[0,01; 0,04]	1,79	[1,67; 1,91]
<b>Combinação simultânea</b>	2,83	[1,92; 3,59]	0,60	[0,47; 0,72]	0,08	[0,01; 0,17]	1,02	[0,92; 1,11]
<b>Combinação sequencial</b>	3,57	[2,25; 4,55]	0,19	[-0,02; 0,39]	0,19	[0,08; 0,36]	1,45	[1,28; 1,64]