



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Gabriela Rodrigues Campos

RADIOTERAPIA E INIBIDOR DA PARP:
COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA PARA 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.

Julho de 2024

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Radioterapia e Inibidor da PARP: Combinação Terapêutica para o Cancro do Pâncreas

Gabriela Rodrigues Campos

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.

Julho de 2024



UNIVERSIDADE DE
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 acknowledgment.

"Pleasure in the job puts perfection in the work."

Aristóteles

Agradecimentos

O meu percurso académico foi marcado por muito esforço e empenho individual, mas também pelo contributo de muitas pessoas que, ao longo destes anos, se foram cruzando comigo. Assim, gostaria de expressar a minha gratidão a todos os que tornaram possível a realização desta dissertação.

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 instituto. Agradeço pelo tempo despendido na revisão deste documento, pelo conhecimento transmitido e pelo espírito crítico e rigor científico que me incutiu.

À Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora desta dissertação, agradeço por toda a orientação e dedicação demonstradas ao longo deste ano. Muito obrigada pela sua constante disponibilidade, simpatia, ajuda, profissionalismo e motivação. Os meus mais sinceros agradecimentos por todos os conhecimentos transmitidos e por todas as críticas construtivas e sugestões feitas durante a revisão desta dissertação.

Ao Mestre Eurico Pereira, coorientador desta dissertação, pelo apoio e orientação imprescindíveis ao longo deste projeto. Agradeço pela presença assídua, dedicação e disponibilidade mesmo quando estava do outro lado do oceano. A sua paixão e entusiasmo contagiante pelo tema foram uma enorme motivação para mim. Obrigada por todo o conhecimento transmitido e pelo esclarecimento de todas as minhas dúvidas. Agradeço ainda todo o tempo dispensado para me ajudar nos procedimentos laboratoriais e na revisão deste documento. Gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento pois a sua orientação foi fundamental.

À Mestre Ana Rita Gomes, que foi como uma segunda coorientadora para mim, por me ter acolhido e integrado no laboratório. Obrigada por todas as explicações de regras, técnicas e protocolos laboratoriais. Agradeço todo o tempo despendido comigo e ajuda desde os primeiros aos últimos dias, não sendo eu sua orientanda. Sou-lhe imensamente grata por tudo o que fez por mim mesmo sem ter de o fazer.

Ao serviço de radioterapia da Unidade Local de Saúde (ULS) de Coimbra, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), por me permitirem utilizar os equipamentos necessários para a irradiação das células. Um agradecimento especial ao Especialista em Física Médica Paulo César Simões pela constante prontidão em despender do seu tempo e serviço, por todos os conhecimentos técnicos transmitidos e pelo esclarecimento de todas as minhas dúvidas.

Aos Mestres Beatriz Serambeque, Catarina Ferreira, Inês Marques e Ricardo Teixo por todos os ensinamentos transmitidos, por toda a ajuda no laboratório e pela convivência ao longo deste ano.

Aos meus grandes pilares ao longo do curso, a Carolina que desde cedo me acolheu e sempre me ajudou ao longo destes 5 anos; a Joana que esteve sempre ao meu lado e foi a minha melhor amiga, agradeço toda a orientação ao longo destes anos e sobretudo toda a ajuda que me deu durante a realização desta dissertação, ser-lhe-ei eternamente grata por tudo o que fez por mim; e a Francisca que sempre se fez presente e me apoiou mesmo estando num curso diferente. Obrigada por todos os momentos de diversão e cumplicidade que vivemos juntas, pela vossa sincera amizade e por todo o carinho que me deram. Estarão sempre no meu coração.

À minha fiel companheira de laboratório Carlota, que esteve sempre comigo desde o primeiro ano do curso. Agradeço por todas as palavras amigas, pela ajuda ao longo do curso e no laboratório, pelo apoio incondicional e pelo incentivo e motivação de irmos escrevendo a dissertação juntas. Sem ti, este processo teria sido muito mais difícil. Tornaste os meus dias mais leves e alegres com a tua simpatia e sentido de humor. Obrigada por teres estado sempre lá para mim, tanto nos bons como nos maus momentos, e por me teres incentivado sempre a ser melhor.

Aos meus amigos do laboratório Beatriz, Margarida e Pedro, que foram a melhor companhia que podia ter tido ao longo deste ano. Obrigada pela alegria constante e pelos momentos de descontração e convívio, principalmente o cafezinho ao sol depois de almoço. Agradeço também toda a ajuda e companheirismo. E ainda à Catarina, Francisca e Sofia obrigada por toda a ajuda sempre que precisei.

Aos meus Coimbrinhas Jn e Jp, que desde a Martim de Freitas estiveram sempre comigo. Obrigada por estes mais de 10 anos de amizade e cumplicidade. Agradeço muito a vossa

amizade genuína, simpatia e forma simples de ser e de ver a vida. Obrigada por me fazerem rir e me darem sempre os melhores conselhos. Levar-vos-ei para o resto da minha vida.

À Abigail, Ana Catarina, Carolina, Ema, Emanuel, Francisca e Trovão obrigada por me terem acompanhado estes 5 anos, por estarem sempre lá para me ouvir, por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos e por todos os momentos inesquecíveis que passámos juntos, que levarei para sempre na minha memória e no coração.

E por último, o meu maior agradecimento à minha mãe Aura, pai Alcino, irmão Rúben, avó São e avó Jorge. Obrigada por fazerem de mim tudo aquilo que sou hoje e por me terem sempre ajudado e incentivado a alcançar os meus objetivos. Além disso, agradeço todo o esforço e sacrifício que fizeram para que eu pudesse seguir este percurso académico. Um agradecimento especial à minha mãe, o meu maior pilar, que desde pequena sempre me deixou escolher o meu percurso, nunca me cortou as asas e sempre me encorajou a sonhar mais alto.

Trabalhos realizados no âmbito desta dissertação

Abstracts submetidos/publicados em revistas científicas:

1. *“Unlocking New Horizons in Pancreatic Cancer Treatment: The Promising Combination of Radiotherapy and PARP Inhibitors”*
Eurico Pereira, Gabriela Campos, Joana Marques, Paulo Simões, Ana M. Abrantes, Pedro Silva-Vaz, Maria F. Botelho, Ana S. Pires
Abstract aceite para comunicação oral
48th European Radiation Research Society Meeting 2024
2. *“Strategic Synergy: PARPi and DNA-DA Combinations Reshaping Pancreatic Cancer Treatment”*
Eurico Pereira, Gabriela Campos, Joana Marques, Ana M. Abrantes, Pedro Silva-Vaz, Maria F. Botelho, Ana S. Pires
Publicado na revista *Molecular Oncology* a 6 de junho de 2024. Doi:
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.13683>
European Association for Cancer Research 2024

Posters submetidos/apresentados em conferências:

1. *“Unlocking New Horizons in Pancreatic Cancer Treatment: The Promising Combination of Radiotherapy and PARP Inhibitors”*
Eurico Pereira, Gabriela Campos, Joana Marques, Paulo Simões, Ana M. Abrantes, Pedro Silva-Vaz, Maria F. Botelho, Ana S. Pires
Comunicação oral a ser apresentada de 10-13 de setembro de 2024 em Aveiro
48th European Radiation Research Society Meeting 2024
2. *“Strategic Synergy: PARPi and DNA-DA Combinations Reshaping Pancreatic Cancer Treatment”*
Eurico Pereira, Gabriela Campos, Joana Marques, Ana M. Abrantes, Pedro Silva-Vaz, Maria F. Botelho, Ana S. Pires
Poster apresentado de 10-13 de junho de 2024 em Roterdão
European Association for Cancer Research 2024

Resumo

O cancro do pâncreas é um dos tipos de cancro com maior taxa de mortalidade a nível mundial, apresentando um número de novos casos quase igual ao número de mortes. Tal deve-se à sua progressão assintomática e natureza agressiva que, aliado a diagnósticos tardios e a opções terapêuticas ineficazes, culmina numa taxa de sobrevivência a 5 anos muito baixa. As atuais opções terapêuticas para esta doença incluem a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. No entanto, a única abordagem potencialmente curativa é a intervenção cirúrgica, quando o tumor é ressecável, opção que só viável para uma pequena percentagem de doentes. Desta maneira, é fundamental a descoberta de novas e eficazes abordagens terapêuticas para o cancro do pâncreas.

A radioterapia é um dos tipos de tratamento do cancro mais utilizados, e envolve o uso de radiação ionizante direcionada ao local do tumor para erradicar as células tumorais, induzindo quebras de cadeia simples (SSBs, do inglês *single-strand breaks*) e quebras de cadeia dupla (DSBs, do inglês *double-strand breaks*) no DNA. Os inibidores da poli (adenosina difosforil) polimerase (iPARP) têm sido estudados como uma estratégia terapêutica para o cancro e atuam inibindo a PARP, que resulta na ausência de reparação de SSBs que se poderão converter em DSBs. Assim, a combinação destas terapias resultará numa sobrecarga de lesões no DNA, com conseqüente morte das células tumorais.

Desta maneira, o principal objetivo desta dissertação foi avaliar o potencial terapêutico da combinação de radioterapia com o iPARP olaparib em duas linhas celulares de cancro do pâncreas (PANC-1 e Hs 766T). Primeiramente foi calculado o tempo de duplicação das duas linhas celulares para um melhor conhecimento das mesmas e estabelecimento das condições experimentais, tendo-se constatado que a linha celular PANC-1 prolifera mais rápido que a linha celular Hs 766T. De seguida foi avaliada a sobrevivência celular após a exposição das células aos tratamentos de radioterapia em monoterapia, olaparib em monoterapia e combinação simultânea de 1 μM de olaparib com doses crescentes de raios-X. Nas condições que incluem tratamento com olaparib foram testadas duas abordagens: a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação e a sua remoção 72h após a sua administração. Os valores de SER obtidos comprovaram que o olaparib radiosensibilizou as células de ambas as linhas celulares, permitindo uma redução de dose de radiação quando comparada com a radioterapia isolada, tendo sido obtida uma melhor eficácia com a estratégia de

permanência do olaparib em contacto com as células durante todo o tempo de incubação. Numa segunda fase, avaliaram-se os efeitos dos tratamentos em monoterapia e em combinação a nível do DNA. Para isso, avaliou-se a genotoxicidade dos tratamentos com 1 μ M de olaparib e 2 Gy de radiação-X em monoterapia e em combinação, onde se verificou que o tratamento combinado apresentou uma maior capacidade de induzir lesões no DNA, que os tratamentos isolados, em ambas as linhas celulares. Estes resultados foram ainda validados pela deteção da presença de DSBs através da quantificação de *foci* γ -H2AX por imunofluorescência, constatando-se que o tratamento combinado induziu uma maior quantidade de DSBs na linha celular PANC-1 que os tratamentos isolados, contudo na linha celular Hs 766T não foram detetadas diferenças entre as condições de controlo e de tratamento.

Concluindo, os resultados indicam que o olaparib radiosensibiliza as células de cancro do pâncreas aos raios-X, tendo o tratamento combinado uma melhor eficácia que os tratamentos isolados.

Palavras-chave: Cancro do pâncreas, radioterapia, inibidores da PARP, combinações terapêuticas.

Abstract

Pancreatic cancer is among the cancers with the highest mortality rate worldwide, with the number of new cases almost equal to the number of deaths. This is attributable to its asymptomatic progression and aggressive nature, which combined with late diagnosis and ineffective therapeutic options, results in a very low 5-year survival rate. Current therapeutic options for this disease include surgery, chemotherapy, and radiotherapy. However, the only potentially curative approach is surgical intervention, if the tumor is resectable, which is feasible only for a small percentage of patients. Therefore, discovering new and effective therapeutic strategies for pancreatic cancer is essential.

Radiotherapy is one of the most widely employed cancer treatments, which involves the use of ionizing radiation targeted at the tumor site to eradicate cancer cells by inducing single-strand breaks (SSBs) and double-strand breaks (DSBs) in DNA. Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) have been studied as a therapeutic strategy for cancer and act by inhibiting PARP, resulting in the absence of SSBs repair that can be converted into DSBs. Thus, the combination of these therapies will result in an accumulation of DNA lesions, leading to the death of cancer cells.

Therefore, the main objective of this dissertation was to evaluate the therapeutic potential of combining radiotherapy with the iPARP olaparib in two pancreatic cancer cell lines (PANC-1 and Hs 766T). Firstly, the doubling time of the two cell lines was calculated for a better understanding of the cell lines and establishment of experimental conditions, showing that the PANC-1 cell line proliferates faster than the Hs 766T cell line. Next, cell survival was assessed after exposure to the treatments of radiotherapy in monotherapy, olaparib in monotherapy, and the simultaneous combination of 1 μ M olaparib with increasing doses of X-rays. For conditions including the treatment with olaparib, two approaches were tested: olaparib remaining throughout the incubation period and its removal 72 hours after administration. The obtained SER values showed that olaparib radiosensitized the cells of both cell lines, allowing for a reduction in radiation dose when compared to radiotherapy alone, with better efficacy achieved when olaparib remained in contact with the cells throughout all the incubation period. In a second phase, the effects of monotherapy and combination treatments at the DNA level were evaluated. To achieve this goal, the genotoxicity of the treatments with 1 μ M olaparib and 2 Gy of X-ray radiation in monotherapy and in combination was assessed, showing that the

combined treatment had a greater capacity to induce DNA lesions than the individual treatments in both cell lines. These results were further validated by detecting the presence of DSBs through the quantification of γ -H2AX foci by immunofluorescence, revealing that the combined treatment caused a higher amount of DSBs in the PANC-1 cell line compared to the individual treatments. However, no differences were detected between the control and treatment conditions in the Hs 766T cell line.

In conclusion, the obtained results indicate that olaparib radiosensitizes pancreatic cancer cells to X-rays, with the combined treatment being more effective than the individual treatments.

Keywords: Pancreatic cancer, radiotherapy, PARP inhibitors, therapeutic combinations.

Índice

Agradecimentos	I
Trabalhos realizados no âmbito desta dissertação	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XIX
Índice de Equações	XXI
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XXIII
1. Introdução	1
1.1 Cancro do pâncreas	3
1.1.1 Pâncreas	3
1.1.2 Epidemiologia	5
1.1.3 Fatores de risco	7
1.1.4 Classificação dos tumores e Patogénese	8
1.1.5 Diagnóstico	10
1.1.6 Tratamento	11
1.2 Radioterapia	12
1.2.1 Física da Radiação	12
1.2.2 Efeitos biológicos da radiação	14
1.2.3 Lesões no DNA	16
1.2.4 Radioterapia externa	18
1.3 Inibidores da PARP	19
1.3.1 Vias de reparação do DNA	19
1.3.2 PARP	22
1.3.3 Inibidores da PARP	22
1.3.4 Mecanismos de radiosensibilização dos iPARP	24
1.3.5 Tipos de inibidores da PARP	24
1.3.6 Resistência aos iPARP	27
2. Objetivos	29
3. Materiais e Métodos	33

3.1	Cultura celular	35
3.2	Tempo de duplicação	38
3.2.1	Análise estatística.....	39
3.3	Tratamentos.....	40
3.3.1	Radioterapia.....	40
3.3.2	Inibidor da PARP.....	42
3.3.3	Combinação	43
3.4	Avaliação da sobrevivência celular	43
3.4.1	Análise estatística.....	46
3.5	Avaliação da genotoxicidade.....	50
3.5.1	Análise estatística.....	51
3.6	Imunofluorescência	52
3.6.1	Análise estatística.....	53
4.	Resultados.....	55
4.1	Tempo de duplicação	57
4.2	Avaliação da sobrevivência celular	58
4.3	Avaliação da genotoxicidade.....	67
4.4	Imunofluorescência	69
5.	Discussão.....	77
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras	85
7.	Bibliografia.....	89
8.	Anexos	103
	Anexo I	105

Índice de Figuras

- Figura 1:** Localização anatômica do pâncreas. O pâncreas encontra-se no abdômen perto do estômago, do intestino delgado, fígado e baço. Retirado de: [6].....4
- Figura 2:** Regiões anatômicas do pâncreas. O pâncreas tem quatro regiões: a cabeça, que é subdividida em cabeça propriamente dita e no processo uncinado, o colo, o corpo e a cauda. Retirado de: [10].....5
- Figura 3:** Taxas padronizadas por idade de incidência e mortalidade para o cancro do pâncreas por região, com destaque do Uruguai e da Hungria. Retirado de: [15].....6
- Figura 4:** A radiação ionizante provoca lesões no DNA por efeitos diretos e indiretos. As lesões diretas resultam da interação direta entre a radiação e o DNA enquanto que as lesões indiretas são causadas pelos radicais livres resultantes da radiólise das moléculas de água presentes nas células. Retirado de: [44]..... 15
- Figura 5:** Esquema representativo das lesões induzidas no DNA pela radiação ionizante. Estas lesões incluem modificações de bases azotadas ou açucares, interações DNA-proteínas, ligações cruzadas, quebras de cadeia simples (SSBs) e quebras de cadeia dupla (DSBs). Retirado de: [49]. Autorização de *copyright* no anexo I. 17
- Figura 6:** Representação de um LINAC utilizado em radioterapia (TrueBeam®). Retirado de: [54]..... 19
- Figura 7:** Tipos de lesões no DNA e respetivas vias de reparação. As quebras de cadeia simples (SSBs) ativam a reparação por excisão de bases (BER) e as quebras de cadeia dupla (DSBs) podem ser reparadas pela junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) ou pela recombinação homóloga (HR). Outros tipos de lesões, como aductos de DNA, ligações cruzadas e bases oxidadas, ativam a reparação por excisão de nucleótidos (NER) e uma mutação no DNA, como uma inserção, uma deleção ou um erro de emparelhamento de bases, ativa a reparação de incompatibilidades (MMR). Retirado de: [56].....20
- Figura 8:** Mecanismo de ação dos inibidores da PARP. A PARP desempenha um papel importante na reparação de lesões no DNA. Os iPARP afetam a reparação por excisão de bases (BER) impedindo a reparação de quebras de cadeia simples (SSBs). A acumulação de SSBs dá origem a quebras de cadeia dupla (DSBs) que, em células deficientes em

recombinação homóloga (HR), não são reparadas, conduzindo à morte celular. Retirado de: [67].	23
Figura 9: Imagens das células PANC-1 (esquerda) e Hs 766T (direita), adquiridas num microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100 vezes.	36
Figura 10: Representação esquemática do procedimento de contagem celular.	38
Figura 11: Fantoma utilizado para a irradiação de células.	41
Figura 12: Sistema de irradiação de células composto pelo LINAC TrueBeam® (Varian, 5219) e pelo fantoma de acrílico.	42
Figura 13: Representação da formação de micronúcleos numa célula binucleada após o bloqueio da citocinese. Adaptada de: [100].	51
Figura 14: Curvas de crescimento da linha celular PANC-1 (a) e Hs 766T (b). Os resultados expressam o número de células vivas (média±desvio padrão) em função do tempo, em horas, de 3 experiências independentes em duplicado.	57
Figura 15: Curvas de sobrevivência obtidas para as linhas celulares PANC-1 (a) e Hs 766T (b) após o tratamento com olaparib em monoterapia para as duas abordagens testadas de permanência do olaparib apenas 72h (OLA72h) ou todo o tempo de incubação (OLATT). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média±desvio padrão) em função da concentração de olaparib, em μM , de pelo menos 5 experiências independentes em duplicado.	59
Figura 16: Gráficos representativos dos valores obtidos de $\text{IC}_{50}\pm\text{desvio padrão}$, para a linha celular PANC-1 (a) e Hs 766T (b). A diferença estatisticamente significativa está representada por * que significa $p<0,05$, determinada pelo teste t de amostras independentes.	60
Figura 17: Comparação dos valores obtidos do fator de sobrevivência do tratamento com 1 μM de olaparib quando o inibidor permaneceu em contacto com as células durante 72h (OLA72h) ou todo o tempo de incubação (OLATT) com o valor de fator de sobrevivência igual a 1, para as linhas celulares PANC-1 (a) e Hs 766T (b). Os resultados estão expressos como a média±desvio padrão do fator de sobrevivência, de 5 experiências independentes em duplicado. A diferença estatisticamente significativa está representada por ** que significa $p<0,01$, determinada pelo teste t de uma amostra.	61

Figura 18: Curvas de sobrevivência obtidas para as linhas celulares PANC-1 (a) e Hs 766T (b) após o tratamento com radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média±desvio padrão) em função da dose de radiação-X, em Gy, de pelo menos 5 experiências independentes em duplicado.62

Figura 19: Gráficos representativos dos valores obtidos dos parâmetros D_{50} (a), D_{10} (b), MID (c), FS_{2Gy} (d), $SER_{D_{50}}$ (e), $SER_{D_{10}}$ (f), SER_{MID} (g) e $SER_{FS_{2Gy}}$ (h) com os desvios padrão, para a linha celular PANC-1. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste estatístico ANOVA unifatorial com correção de *Tukey* para comparações múltiplas.....66

Figura 20: Gráficos representativos dos valores obtidos dos parâmetros D_{50} (a), D_{10} (b), MID (c), FS_{2Gy} (d), $SER_{D_{50}}$ (e), $SER_{D_{10}}$ (f), SER_{MID} (g) e $SER_{FS_{2Gy}}$ (h) com os desvios padrão, para a linha celular Hs 766T. A diferença estatisticamente significativa está representada por * que significa $p < 0,05$, determinada pelo teste estatístico ANOVA unifatorial com correção de *Tukey* para comparações múltiplas.....67

Figura 21: Avaliação da genotoxicidade na linha celular PANC-1: (a) Imagem representativa da presença de micronúcleos (MN) numa célula binucleada (BN); (b) Quantificação de células BN com MN sem tratamento (controlo) e com os tratamentos de 1 μM de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μM de olaparib com 2 Gy de radiação-X; e (c) Quantificação de células BN com 1, 2 e 3 ou mais MN de controlo e com os tratamentos. Os resultados estão expressos em média±desvio padrão da percentagem de células BN com MN de 3 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * que significa $p < 0,05$, determinadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.....68

Figura 22: Avaliação da genotoxicidade na linha celular Hs 766T: (a) Imagem representativa da presença de micronúcleos (MN) numa célula binucleada (BN); (b) Quantificação de células BN com MN sem tratamento (controlo) e com os tratamentos de 1 μM de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μM de olaparib com 2 Gy de radiação-X; e (c) Quantificação de células BN com 1, 2 e 3 ou mais MN de controlo e com os tratamentos. Os resultados

estão expressos em média±desvio padrão da percentagem de células BN com MN de 3 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * que significa $p < 0,05$, determinadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.69

Figura 23: Imagens de imunofluorescência de núcleos de células marcados com DAPI (azul), *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo (vermelho) e sobreposição das duas marcações para a condição de controlo, 1 μ M de olaparib, 2 Gy de raios-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X, 24h após os tratamentos, em células da linha celular PANC-1.....71

Figura 24: Quantificação de *foci* de γ -H2AX às 24 horas nas células da linha celular PANC-1, para a condição de controlo, tratamento com 1 μ M de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de radiação-X. (a) Número de *foci* de γ -H2AX por núcleo; (b) Percentagem de núcleos positivos para γ -H2AX; e (c) Média da intensidade de fluorescência por *foci*. Os resultados encontram-se expressos como média±desvio padrão. A experiência foi realizada 3 vezes em duplicado e não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.72

Figura 25: Imagens de imunofluorescência de núcleos de células marcados com DAPI (azul), *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo (vermelho) e sobreposição das duas marcações para a condição de controlo, 1 μ M de olaparib, 2 Gy de raios-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X, 2h após os tratamentos, em células da linha celular Hs 766T.73

Figura 26: Imagens de imunofluorescência de núcleos de células marcados com DAPI (azul), *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo (vermelho) e sobreposição das duas marcações para a condição de controlo, 1 μ M de olaparib, 2 Gy de raios-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X, 24h após os tratamentos, em células da linha celular Hs 766T.74

Figura 27: Quantificação de *foci* de γ -H2AX às 2 e 24 horas nas células da linha celular Hs 766T, para a condição de controlo, tratamento com 1 μ M de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de radiação-X. (a) e (d): Número de *foci* de γ -H2AX por núcleo às 2h e 24h, respetivamente; (b) e (e): Percentagem de núcleos positivos para γ -H2AX às 2h e 24h, respetivamente; (c) e (f) Média da intensidade de fluorescência por *foci* às 2h e 24h, respetivamente. Os resultados encontram-se expressos como média±desvio padrão. A experiência foi realizada 2 vezes em duplicado no caso das 2h e 3 vezes (n=3) em

duplicado no caso das 24h. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.75

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação tumor, gânglio, metástase (TNM) do cancro do pâncreas. Retirado de: [29].	9
Tabela 2: Histórico de aprovação dos iPARP pela FDA e EMA. Retirado de: [57].	26
Tabela 3: Representação dos iPARP aprovados pela FDA e EMA e respetivas diferenças nos mecanismos de ação. Retirado de: [69].	27
Tabela 4: Número de células semeadas por poço, para cada linha celular, para cada uma das doses de raios-X utilizadas.	44
Tabela 5: Valores do tempo de duplicação (DT) e respetivas incertezas, em horas, coeficiente de determinação R^2 e tempo de incubação calculado para o ensaio clonogénico, em dias, para ambas as linhas celulares.	58
Tabela 6: Valores de IC_{50} e respetivas incertezas obtidos após a administração isolada de olaparib com a sua remoção 72h depois (OLA72h) ou a sua permanência durante todo o tempo de incubação (OLATT) e valor do coeficiente de determinação R^2 para a linha celular PANC-1.	60
Tabela 7: Valores de IC_{50} e respetivas incertezas obtidos após a administração isolada de olaparib com a sua remoção 72h depois (OLA72h) ou a sua permanência durante todo o tempo de incubação (OLATT) e valor do coeficiente de determinação R^2 para a linha celular Hs 766T.	60
Tabela 8: Valores dos parâmetros α e β do modelo linear quadrático, da razão α/β , dos parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} e as suas respetivas incertezas, bem como o valor do coeficiente de determinação R^2 , obtidos para o tratamento de radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular PANC-1. 65	
Tabela 9: Valores dos parâmetros $SER_{D_{50}}$, $SER_{D_{10}}$, SER_{MID} e $SER_{FS_{2Gy}}$ com as suas respetivas incertezas, associados aos tratamentos combinados de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e de radioterapia com	

olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular PANC-1.....65

Tabela 10: Valores dos parâmetros α e β do modelo linear quadrático, da razão α/β e dos parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} e as suas respectivas incertezas, bem como o valor do coeficiente de determinação R^2 , obtidos para o tratamento de radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular Hs 766T. 65

Tabela 11: Valores dos parâmetros $SER_{D_{50}}$, $SER_{D_{10}}$, SER_{MID} e $SER_{FS_{2Gy}}$ com as suas respectivas incertezas, associados aos tratamentos combinados de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular Hs 766T.....66

Índice de Equações

Equação 1: Fórmula utilizada para o cálculo da concentração celular.	38
Equação 2: Equação de crescimento exponencial, onde y representa o número de células vivas num determinado período de tempo x , y_0 é o número inicial de células vivas quando $x=0$, k representa a taxa de crescimento da população e x o tempo.	40
Equação 3: Expressão utilizada para calcular o tempo de duplicação (DT).	40
Equação 4: Expressão utilizada para calcular a incerteza associada ao tempo de duplicação (DT).	40
Equação 5: Fórmula utilizada para calcular a eficiência de placa (PE).	46
Equação 6: Fórmula utilizada para calcular o fator de sobrevivência (FS).	46
Equação 7: Expressão do modelo linear em radiobiologia, em que FS representa a fração de células sobreviventes, α o parâmetro linear (Gy^{-1}) e D a dose de radiação (Gy).	47
Equação 8: Expressão do modelo linear quadrático em radiobiologia, em que FS representa a fração de células sobreviventes, α o parâmetro linear (Gy^{-1}), β o parâmetro quadrático (Gy^{-2}) e D a dose de radiação (Gy).	47
Equação 9: Fórmula utilizada para calcular o D_{50} (FS=0,50) e o D_{10} (FS=0,10).	48
Equação 10: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao D_{50} (FS=0,50) e ao D_{10} (FS=0,10).	48
Equação 11: Fórmula utilizada para o cálculo do SER para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib, através dos valores de D_{50} (FS=0,50) e D_{10} (FS=0,10).	49
Equação 12: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao $\text{SER}_{D_{50}}$ (FS=0,50) e ao $\text{SER}_{D_{10}}$ (FS=0,10) para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib.	49
Equação 13: Fórmula utilizada para o cálculo do SER para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib, através dos valores de $\text{FS}_{2\text{Gy}}$	49
Equação 14: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao $\text{SER}_{\text{FS}_{2\text{Gy}}}$ para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib.	49

Equação 15: Fórmula utilizada para o cálculo do SER para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib, através do conceito MID.....50

Equação 16: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao SER_{MID} para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib.50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

53BP1: Proteína 1 de ligação à P53

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ATC: *Anatomical Therapeutic Chemical*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BER: Reparação por excisão de bases

BN: Binucleadas

BRCA1: Breast Cancer gene 1

BRCA2: Breast Cancer gene 2

BSA: Albumina sérica bovina

CA19-9: Antígeno para a proteína 19-9

CHUC: Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

D₁₀: Dose de radiação que diminui a sobrevivência celular para 10%

D₅₀: Dose de radiação que diminui a sobrevivência celular para 50%

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSB: Quebra de cadeia dupla

EMA: *European Medicines Agency*

eV: Eletrão-volt

FBS: Soro bovino fetal

FDA: *Food and Drug Administration*

FDG: ¹⁸F-fluorodeoxiglicose

FS: Fator de sobrevivência

FS_{2Gy}: Fração de células sobrevivente à dose de radiação de 2 Gy

Gy: *Gray*

HR: Recombinação homóloga

IC₅₀: Concentração inibitória média
iPARP: Inibidores da poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase
IPMN: Neoplasia mucinosa papilar intraductal
LET: Transferência linear de energia
LINAC: Acelerador linear
MCN: Neoplasia quística mucinosa
MID: Dose média de inativação
MIF: Média da intensidade de fluorescência
MLC: Colimador multifolha
MMR: Reparação de incompatibilidades
MN: Micronúcleos
MU: Unidades de monitor
NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDF: Fator de difusão nuclear
NER: Reparação por excisão de nucleótidos
NHEJ: Junção de extremidades não-homólogas
OER: Relação do enriquecimento em oxigênio
OMS: Organização Mundial de Saúde
PanIN: Neoplasia intraepitelial pancreática
PAR: Poli (ADP-ribose)
PARP: Poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase
PBS: *Phosphate-buffered saline*
PDAC: Adenocarcinoma ductal pancreático
PE: Eficiência de placa
RBE: Eficiência biológica relativa
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SER: Rácio de aumento da sensibilização
SI: Sistema internacional
SSB: Quebra de cadeia simples
STR: *Short tandem repeat*
TNM: Tumor, gânglio, metástase
ULS: Unidade Local de Saúde

1. Introdução

1.1 Cancro do pâncreas

O cancro, também designado por tumor maligno ou neoplasia, é uma doença que pode ter origem em quase todos os órgãos ou tecidos, ocorrendo quando células anormais crescem e se dividem descontroladamente [1,2]. Estas células tumorais apresentam a capacidade de se disseminar e de invadir outros tecidos e órgãos, sendo este processo designado por metastização, que agrava a doença e dificulta o processo de tratamento [2].

As células crescem e multiplicam-se através da divisão celular, sendo o ciclo celular o processo através do qual crescem, duplicam o material genético e se dividem em células filhas [3]. Este ciclo é altamente regulado, através de pontos de verificação que, quando detetam anomalias, podem conduzir à morte celular programada [4]. No entanto, este sistema de verificação pode ser contornado pela presença de proteínas ou de genes mutados, permitindo que células anormais ou danificadas consigam evoluir no ciclo celular, podendo resultar em cancro [4].

1.1.1 Pâncreas

O pâncreas é um órgão retroperitoneal, de 15 a 25 cm de extensão no seu maior eixo, que faz parte do sistema digestivo e do sistema endócrino. Este órgão localiza-se atrás do estômago, na parte superior esquerda do abdómen e é rodeado por outros órgãos como o intestino delgado, o fígado e o baço (**Figura 1**) [5].

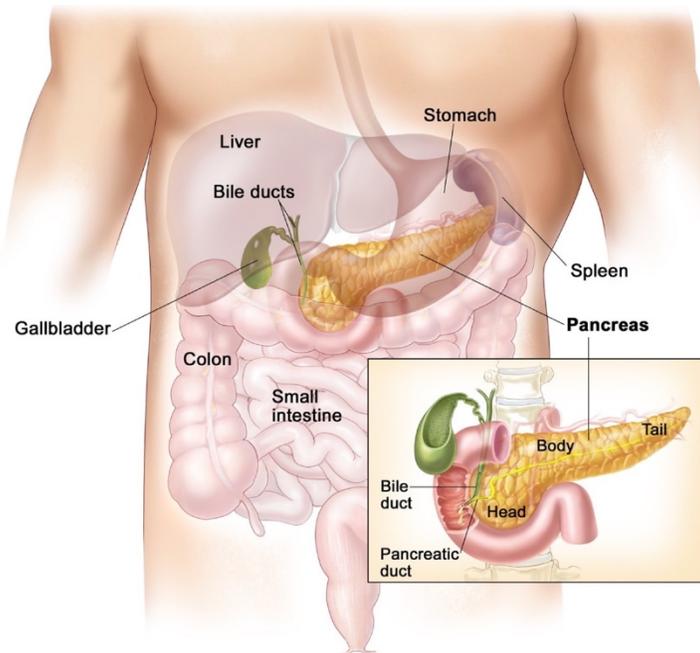


Figura 1: Localização anatômica do pâncreas. O pâncreas encontra-se no abdômen perto do estômago, do intestino delgado, fígado e baço. Retirado de: [6].

O pâncreas é uma glândula mista, uma vez que apresenta uma porção exócrina e uma porção endócrina [5]. A porção exócrina secreta o suco pancreático, que contém enzimas digestivas que são libertadas no duodeno e atuam na digestão de gorduras (ex: lípase), de proteínas (ex: tripsina e quimiotripsina) e de hidratos de carbono (ex: amílase). Por outro lado, a porção endócrina produz hormonas como a insulina, o glucagon, a somatostatina, a gastrina e o polipeptídeo pancreático. A insulina e o glucagon ajudam a controlar a glicemia – o glucagon liberta a glicose no sangue e é produzido pelas células alfa dos ilhéus de *Langerhans* e a insulina transporta a glicose do sangue para o interior das células, sendo produzida pelas células beta dos ilhéus de *Langerhans* [7–9].

Considera-se que o pâncreas está dividido em quatro regiões: a cabeça, o colo, o corpo e a cauda (**Figura 2**) [9]. A cabeça é a parte mais larga da glândula, é cercada pela curva em forma de C do duodeno e é subdividida na cabeça propriamente dita e no processo uncinado [9,10]. O colo é a parte mais estreita entre a cabeça e o corpo. O corpo constitui a maior parte do pâncreas estando entre o colo e a cauda. E a cauda é a extremidade mais fina que se estende para o lado esquerdo próxima ao hilo do baço [9,10].

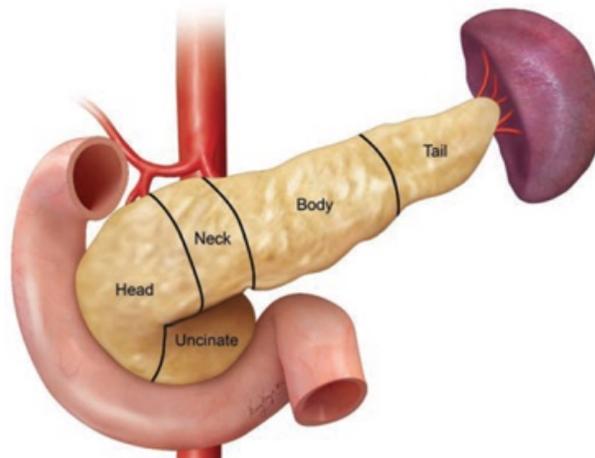


Figura 2: Regiões anatômicas do pâncreas. O pâncreas tem quatro regiões: a cabeça, que é subdividida em cabeça propriamente dita e no processo uncinado, o colo, o corpo e a cauda. Retirado de: [10].

A maioria dos tumores malignos do pâncreas localiza-se na cabeça e no colo do pâncreas (65%) mas também podem ocorrer no corpo (15%), na cauda (10%) ou serem multifocais (2%) [11]. No que diz respeito à metastização, esta neoplasia maligna tende a espalhar-se para os gânglios linfáticos, o fígado, o peritoneu (revestimento da cavidade abdominal) e os pulmões [12].

1.1.2 Epidemiologia

O cancro do pâncreas é um dos tipos de cancro com maior taxa de mortalidade a nível mundial, sendo o número de novos casos (incidência) quase igual ao número de mortes (mortalidade). Isto deve-se à sua progressão assintomática e natureza agressiva, aliado a diagnósticos tardios e a opções terapêuticas ineficazes [13]. Assim, a taxa de sobrevivência a 5 anos dos portadores de cancro do pâncreas é baixa, sendo cerca de 5% [14].

De acordo com os dados do *Global Cancer Observatory: Cancer Today* da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2022 o cancro do pâncreas foi a 14^a neoplasia maligna mais comum e a 6^a principal causa de morte por cancro, em todo o mundo [15,16].

O número de novos casos de cancro do pâncreas, a nível mundial, no ano de 2022 foi de 510 570 casos em ambos os sexos, tendo sido ligeiramente superior no sexo masculino (269 586 casos – 53%) do que no sexo feminino (240 984 – 47%). Relativamente à mortalidade, o número total de mortes mundialmente foi de 466 983 em ambos os sexos,

tendo sido contabilizadas, novamente, mais no sexo masculino (247 459 – 53%) do que no sexo feminino (219 524 – 47%) [15,16]. No entanto, não são conhecidos os mecanismos que influenciam estas diferenças entre sexos, sendo atualmente associadas ao estilo de vida e a fatores ambientais [17].

Quanto à localização geográfica, a nível mundial, as taxas padronizadas por idade de incidência e de mortalidade mais elevadas desta neoplasia foram assinaladas na Hungria (10,4 casos e 9,6 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente) e no Uruguai (11,4 casos e 9,4 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente), em 2022 (Figura 3) [15,16].

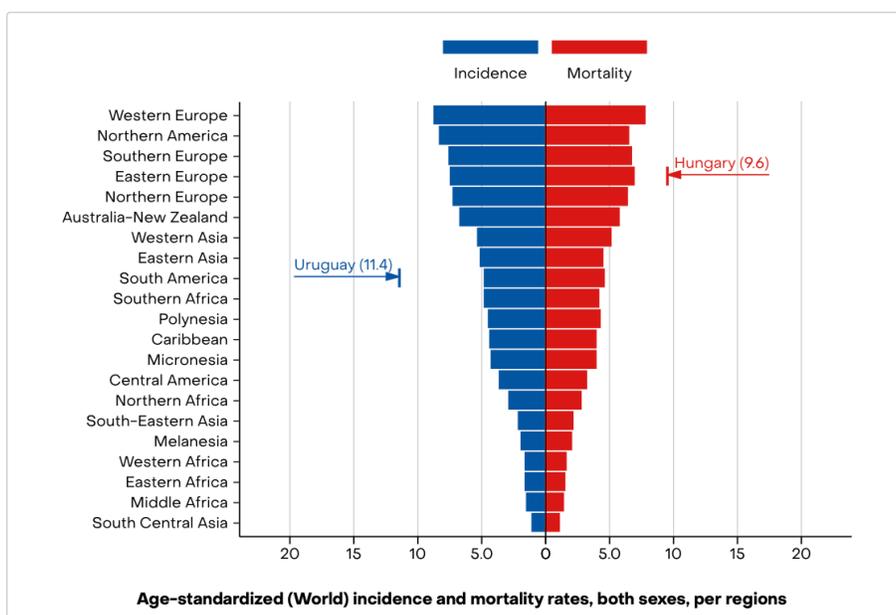


Figura 3: Taxas padronizadas por idade de incidência e mortalidade para o cancro do pâncreas por região, com destaque do Uruguai e da Hungria. Retirado de: [15].

Em Portugal, no mesmo ano, o cancro do pâncreas foi considerado o 11º tipo de cancro com maior número de novos casos, tendo sido registados 2 158 novos casos e o 5º tipo de cancro com maior número de mortes, tendo sido assinaladas 2 086 mortes, um número bastante semelhante ao número de novos casos. Além disso, a prevalência do cancro do pâncreas a 5 anos foi de 1 607 casos, entre todas as idades [15,16].

1.1.3 Fatores de risco

Um fator de risco é uma característica, condição ou comportamento que aumenta a probabilidade de um indivíduo vir a desenvolver uma doença, neste caso, o cancro do pâncreas [18]. No entanto, apesar dos fatores de risco para o cancro do pâncreas tornarem os indivíduos mais suscetíveis ao seu desenvolvimento, a sua presença não garante necessariamente a ocorrência da doença, tendo sido identificados apenas em 40% dos casos [19].

Os fatores de risco podem ser divididos em duas categorias: modificáveis e não modificáveis. Os modificáveis podem ser controlados pelos indivíduos e incluem o tabagismo, o álcool, a obesidade, os fatores dietéticos e a exposição a substâncias tóxicas; enquanto os não modificáveis, que não podem ser controlados, compreendem o sexo, a idade, a etnia, a diabetes *mellitus*, a história familiar de cancro do pâncreas e os fatores genéticos [20].

Relativamente ao sexo, tal como descrito anteriormente, o cancro do pâncreas é ligeiramente mais comum no sexo masculino do que no sexo feminino, possivelmente devido a fatores de risco ambientais ou profissionais, assim como ao estilo de vida [20].

Quanto à idade, o cancro do pâncreas predomina na população mais idosa, onde a maioria dos doentes apresenta mais de 50 anos. Comprovou-se que o desenvolvimento de cancro do pâncreas raramente ocorre antes dos 40 anos de idade e atinge o pico de incidência entre os 70 e 80 anos de idade [17,20].

No que diz respeito à etnia, a população negra apresenta um risco de desenvolvimento de cancro do pâncreas consideravelmente maior do que qualquer outro grupo étnico, sendo que estas diferenças podem estar associadas a fatores de risco modificáveis como a dieta e a insuficiência de vitamina D ou a fatores genéticos [20].

A diabetes *mellitus* é considerada tanto um fator de risco como uma consequência do cancro do pâncreas, uma vez que, vários recém diagnosticados referem o início da diabetes ou um agravamento da mesma [21].

A história familiar de cancro do pâncreas refere-se a famílias em que parentes de primeiro grau foram diagnosticados com esta doença. Este fator de risco é responsável por cerca de 5-10% dos casos desta neoplasia. Os indivíduos com parentes de primeiro grau com este

tumor maligno apresentam um risco nove vezes superior de desenvolver esta doença do que a restante população [20].

Os fatores genéticos também estão relacionados com o aumento do risco de cancro do pâncreas onde, sensivelmente, 10% dos doentes têm predisposição genética para desenvolver esta doença. O cancro do pâncreas encontra-se associado a síndromes familiares de cancro como a síndrome hereditária do cancro da mama e do ovário associada aos genes supressores tumorais *BRCA1* (do inglês, *breast cancer gene 1*) e *BRCA2* (do inglês, *breast cancer gene 2*), onde as mutações na linha germinativa do gene *BRCA2* são a principal causa de cancro do pâncreas hereditário [20].

1.1.4 Classificação dos tumores e Patogénese

Os tipos de tumores malignos do pâncreas podem ser divididos em dois grandes grupos: exócrinos e neuroendócrinos [22,23].

Os cancros pancreáticos neuroendócrinos são mais raros, representando menos de 5% de todos os cancros do pâncreas e são, geralmente, caracterizados por um melhor prognóstico [24,25]. Estes desenvolvem-se a partir de células endócrinas do pâncreas que secretam hormonas [23]. Neste grupo encontram-se o gastrinoma, o insulinoma e o glucagonoma [23].

Relativamente aos cancros pancreáticos exócrinos, estes constituem mais de 95% de todos os cancros do pâncreas e desenvolvem-se a partir das células exócrinas que produzem enzimas envolvidas na digestão [25]. Estes incluem o adenocarcinoma ductal pancreático, o carcinoma adenoescamoso, o carcinoma indiferenciado, o carcinoma de células acinares e o pancreatoblastoma [22,25].

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, do inglês *pancreatic ductal adenocarcinoma*), que começa nas células que revestem os ductos pancreáticos, é o tipo mais comum de cancro do pâncreas [26,27]. Este tipo de cancro do pâncreas será o alvo de estudo da presente dissertação, sendo que representa mais de 90% dos diagnósticos desta doença [26,27]. Além disso, 60-70% dos casos de PDAC surgem na cabeça do pâncreas [26].

De acordo com a classificação tumor, gânglio, metástase (TNM, do inglês *tumor, node, metastasis*) do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), o cancro do pâncreas pode ser classificado em estádios de grau I a IV (**Tabela 1**). Os estádios I e II compreendem os tumores ressecáveis, que se encontram exclusivamente no pâncreas, sem envolvimento dos vasos sanguíneos circundantes [28]. Os tumores de estágio III são considerados “*borderline resectable*” ou localmente avançados, uma vez que, neste caso, atingem alguns vasos sanguíneos circundantes [28]. E o estágio IV refere-se à doença metastática que é considerada irresssecável devido à sua metastização para o tronco celíaco ou para a artéria mesentérica [28].

Tabela 1: Classificação tumor, gânglio, metástase (TNM) do cancro do pâncreas. Retirado de: [29].

T	Primary Tumor	N	Number of Regional PLNs	Stage	T	N	M
T1	≤2 cm	N0	0	IA	1	0	0
T2	>2 cm, ≤4 cm	N1	1 to 3	IB	2	0	0
T3	>4 cm	N2	≥4	IIA	3	0	0
T4	CA, SMA, and/or CHA invasion			IIB	1–3	1	0
				III	4	Any	0
					Any	2	
				IV	Any	Any	1

Abbreviations: PLN—positive lymph node; CA—celiac axis; SMA—superior mesenteric artery; CHA—common hepatic artery.

Numa análise patológica, o PDAC é constituído por células malignas com uma arquitetura aleatória, inseridas num estroma desmoplásico denso [30]. O PDAC surge de lesões pré-malignas não invasivas que são curáveis se forem detetadas e tratadas precocemente [30]. São estas, a neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN, do inglês *pancreatic intraepithelial neoplasia*), a neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN, do inglês *intraductal papillary mucinous neoplasm*) e a neoplasia quística mucinosa (MCN, do inglês *mucinous cystic neoplasm*) [30].

No entanto, mutações somáticas em oncogenes e/ou em genes supressores tumorais podem também ser a causa do aparecimento de PDAC. Os genes mutados que mais frequentemente estão associados a esta neoplasia são o oncogene *KRAS* e o gene supressor tumoral *TP53* [30].

1.1.5 Diagnóstico

O PDAC é uma neoplasia maligna que apresenta um prognóstico desfavorável devido à grande dificuldade de fazer um diagnóstico precoce e à limitada eficácia terapêutica [26]. O diagnóstico tardio deve-se não só ao desenvolvimento inicial assintomático, mas também à localização retroperitoneal do pâncreas [31]. Assim, no momento do diagnóstico, 35% dos doentes já apresentam PDAC localmente avançado e 45% apresentam metástases à distância [28].

Os sintomas desta doença são inespecíficos e incluem dor abdominal, dores dorsolombares, perda de apetite, perda de peso, náuseas e vômitos, alteração do hábito intestinal, icterícia (pele e olhos amarelados e urina escura) e aparecimento ou agravamento da diabetes [31].

A biopsia é a técnica que faz o diagnóstico de cancro do pâncreas, onde se remove uma pequena amostra do tumor para posterior análise laboratorial [32]. Para o cancro do pâncreas localizado, as biopsias são geralmente obtidas durante uma ecografia guiada por ultrassons ou uma colangiopancreatografia retrógrada endoscópica, enquanto que para doentes com metástases é preferida uma biopsia do local mais acessível como, por exemplo, uma biopsia hepática por aspiração de agulha fina guiada por tomografia computadorizada [32,33].

Dentro das técnicas utilizadas para complementar o diagnóstico do cancro do pâncreas destacam-se os exames imagiológicos e as análises de sangue. As técnicas de imagem mais comuns são a ecografia abdominal, a tomografia computadorizada trifásica abdominal com contraste, a ressonância magnética nuclear e a tomografia por emissão de positrões [34].

A ecografia abdominal é comumente utilizada como um meio complementar de diagnóstico inicial para doentes que apresentam dor abdominal ou icterícia [31]. A tomografia computadorizada trifásica abdominal com contraste é o exame complementar de imagem mais utilizado no diagnóstico putativo e no estadiamento do cancro do pâncreas [31,34], sendo utilizada a ressonância magnética nuclear em doentes com contra-indicações à tomografia computadorizada [31]. E a tomografia por emissão de positrões utiliza, maioritariamente, um análogo da glicose radiomarcado, o ^{18}F -fluorodeoxiglicose (FDG), na distinção entre lesões benignas e malignas [34].

Relativamente às análises de sangue, atualmente o antigénio para a proteína 19-9 (CA19-9, do inglês *carbohydrate antigen 19-9*) é o único biomarcador tumoral aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o cancro do pâncreas, contudo, não é específico nem sensível nos estádios iniciais desta neoplasia. No entanto, além de, aliado a outros exames, fornecer informações que auxiliam a confirmação da suspeita, o CA19-9 também pode ser utilizado para avaliar a eficácia do tratamento [28].

1.1.6 Tratamento

As atuais opções terapêuticas para o cancro do pâncreas incluem a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. No entanto, têm-se demonstrado pouco eficazes devido à natureza agressiva desta neoplasia, surgindo assim a necessidade de se desenvolverem novas e eficazes abordagens terapêuticas [35].

As opções cirúrgicas dependem da localização anatómica do tumor e compreendem a pancreatoduodenectomia (procedimento de *Whipple*) quando o tumor se encontra na cabeça do pâncreas, a pancreatectomia distal para tumores na cauda do pâncreas e a pancreatectomia total que envolve todo o pâncreas [36].

Na quimioterapia, as abordagens terapêuticas mais utilizadas para esta doença são a gemcitabina e o regime FOLFIRINOX, que é uma combinação dos fármacos 5-fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano [28].

O papel da radioterapia ainda é controverso, no entanto, no tratamento do cancro do pâncreas, é utilizada a quimiorradioterapia como abordagem neoadjuvante, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor para uma resseção com margens mais claras [28].

No plano de tratamento, as modalidades e respetiva sequência a ser utilizada depende do estágio do tumor: ressecável, “*borderline resectable*”, localmente avançado ou metastático [37]. Designa-se cancro do pâncreas ressecável quando o tumor é elegível para remoção cirúrgica encontrando-se o tumor apenas no pâncreas ou na área circundante e não se estendendo aos vasos sanguíneos adjacentes [38]. No entanto, apenas 15-20% dos doentes são considerados elegíveis para cirurgia no momento do diagnóstico, e após a resseção a possibilidade de reincidência é de 85% [28]. Assim, neste estágio, as opções de tratamento passam pela resseção cirúrgica seguida de quimioterapia adjuvante [37]. No estágio

“borderline resectable” o tumor atinge alguns vasos sanguíneos circundantes, o que dificulta a remoção total das células tumorais [38]. Neste caso, as opções terapêuticas são a quimioterapia ou quimiorradioterapia neoadjuvante, de forma a reduzir o tamanho do tumor para uma resseção com margens mais claras, seguida de quimioterapia adjuvante e resseção cirúrgica, se elegível [28,37]. Os tumores pancreáticos localmente avançados e metastáticos são considerados irresssecáveis [37]. O estágio de localmente avançado desta doença refere-se à ocorrência de invasão local do tumor e o metastático à disseminação do tumor primário para outros órgãos distantes [37]. A doença neste estágio é considerada incurável, uma vez que a resseção cirúrgica é considerada a única abordagem curativa [37]. Assim, nestes casos, a terapia paliativa passa por quimioterapia sistêmica com gemcitabina [37].

1.2 Radioterapia

A descoberta dos raios-X foi um marco histórico e revolucionador da física e da medicina. Foi em novembro de 1895, que *Wilhelm Conrad Röntgen* detetou uma radiação eletromagnética com um comprimento de onda sub-nanométrico a que denominou raios-X, para acentuar a sua natureza desconhecida. Foi pouco tempo depois desta descoberta, que se começou a utilizar a radiação para fins terapêuticos [39,40].

1.2.1 Física da Radiação

A radiação é uma forma de energia libertada na forma de ondas eletromagnéticas ou de partículas. A radiação eletromagnética transmite a sua energia através de fotões e compreende ondas rádio, micro-ondas, infravermelhos, luz visível, ultravioleta, raios-X e raios- γ , que dependem da frequência e da energia dos fotões [39]. As partículas, em física, são caracterizadas por propriedades como o volume, a densidade e a massa, existindo as partículas carregadas como os prótons, as partículas β (elétrões ou positrões), as partículas α e os elétrões *Auger*, e as partículas não carregadas como os neutrões [39].

A radiação pode, ainda, ser classificada em radiação ionizante e não ionizante dependendo da quantidade de energia depositada. Contrariamente à radiação não ionizante, a radiação ionizante possui energia suficiente para ejetar elétrões de átomos ou de moléculas com que interage, ionizando-os [41,42]. A radiação ionizante eletromagnética compreende os raios-X e

os raios- γ e, na forma de partículas os prótons, os neutrões, as partículas α , as partículas β e os elétrons *Auger* [39].

A radiação ionizante eletromagnética interage com a matéria através de cinco processos: o efeito fotoelétrico, o efeito de *Compton* e o efeito de *Rayleigh*, se a radiação interage com os elétrons orbitais; ou através da produção de pares e de reações fotonucleares, se a radiação interage com o núcleo [43].

No efeito fotoelétrico, um elétron atômico absorve toda a energia do fóton incidente. Este último desaparece e o elétron é ejetado para fora do átomo, tornando-se num fotoelétrão. Parte da energia do fóton incidente é utilizada para remover o elétron do seu nível energético e a restante energia é transferida ao elétron sob a forma de energia cinética. Apesar deste processo poder ocorrer com qualquer elétron do átomo, desde que a energia cinética do fóton incidente seja maior que a energia de ligação do elétron, ocorre sobretudo nos elétrons das camadas internas do átomo, que estão mais fortemente ligados ao núcleo atômico. Por fim, o átomo atingido pelo fóton sofre um rearranjo dos elétrons periféricos de forma a preencher a lacuna deixada pelo elétron ejetado [39,43].

O efeito de *Compton* acontece quando um fóton colide com um elétron das camadas mais externas do átomo e só parte da sua energia é cedida ao elétron. O elétron é então ejetado do átomo com energia cinética, enquanto o fóton incidente sofre um desvio na sua trajetória. A energia cinética do elétron diminui progressivamente à medida que este vai ionizando ou excitando outros átomos. Desta maneira, os elétrons de alta energia desempenham um papel importante na distribuição de dose no material irradiado, uma vez que transportam e depositam energia noutros locais para além do local de interação do fóton incidente. Também neste processo, a lacuna do elétron ejetado é preenchida por um elétron de outra camada [39,43].

Quanto ao efeito de *Rayleigh*, a interação entre o fóton incidente e o elétron é insuficiente para produzir excitação ou ionização. O fóton é absorvido pelo átomo, sendo posteriormente reemitido, sem qualquer alteração do seu estado energético, mudando apenas a sua direção. Este efeito tem pouca relevância no contexto de radioterapia, uma vez que não deposita energia e, por isso, não contribui para a dose absorvida [43].

A produção de pares ocorre quando um fóton incidente de energia cinética elevada (maior que 1,022 MeV) passa próximo do núcleo atômico, ficando sujeito ao intenso campo elétrico

nuclear. O resultado é então a materialização da energia originando-se um par elétron-positrão. O fóton incidente desaparece e o excesso de energia além de 1,022 MeV converte-se em energia cinética do par elétron-positrão. Estas partículas formadas têm a capacidade de ionizar átomos denominando-se partículas ionizantes secundárias. Quando o positrão tiver perdido quase toda a sua energia combina-se com um elétron do meio, estes aniquilam-se e dão origem a dois fótons divergentes com 511 keV cada [39,43].

Finalmente, nas reações fotonucleares um fóton de alta energia incide no núcleo, ejetando um ou mais nucleões (neutrões ou prótons). Os nucleões ejetados interagem adicionalmente com os tecidos biológicos, contribuindo para a dose de radiação total [43].

1.2.2 Efeitos biológicos da radiação

A radiação ionizante, quando interage com células ou tecidos, provoca lesões biológicas que podem prejudicar a viabilidade celular. Estas lesões resultam da ação direta ou indireta da radiação ionizante (**Figura 4**). Os efeitos diretos acontecem quando a radiação ionizante interage com moléculas-alvo críticas, como o DNA, os lípidos e as proteínas, provocando a sua ionização ou excitação, o que inicia uma cadeia de acontecimentos que conduz à alteração das biomoléculas. Já os efeitos indiretos ocorrem quando a radiação ionizante interage com as moléculas de água, que são o principal constituinte da célula. Esta radiólise da água origina radicais livres como é o caso das espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) que são altamente reativas com alvos críticos [39].

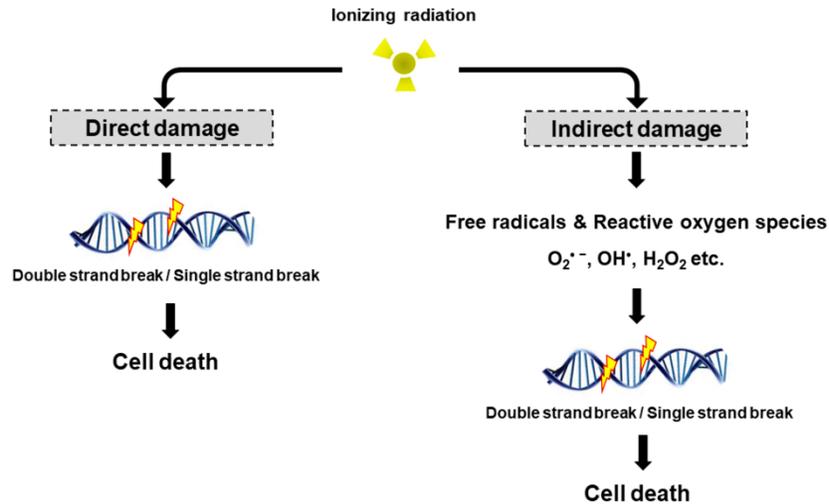


Figura 4: A radiação ionizante provoca lesões no DNA por efeitos diretos e indiretos. As lesões diretas resultam da interação direta entre a radiação e o DNA enquanto que as lesões indiretas são causadas pelos radicais livres resultantes da radiólise das moléculas de água presentes nas células. Retirado de: [44].

Existem três fatores que afetam a resposta biológica à radiação ionizante, são eles a transferência linear de energia (LET, do inglês *linear energy transfer*), a eficiência biológica relativa (RBE, do inglês *relative biological effectiveness*) e a relação do enriquecimento em oxigênio (OER, do inglês *oxygen enhancement ratio*) [45].

A LET refere-se à quantidade de energia transferida por unidade de comprimento de percurso [39]. À medida que a intensidade da ionização aumenta, aumenta também a probabilidade de deposição de energia diretamente nas moléculas biológicas, ou seja, de ocorrer lesão celular [39]. Quanto maior for a LET da radiação, maior é a probabilidade de haver interação biológica [39]. Os raios-X, os raios- γ e os elétrons são considerados radiação de baixo LET enquanto as partículas α e os neutrões são considerados radiação de alto LET, uma vez que depositam energia altamente condensada [46]. O valor que é geralmente considerado para marcar a distinção entre o baixo e alto LET é de cerca de $10 \text{ keV}/\mu\text{m}$. A radiação de alto LET induz sobretudo lesões diretas enquanto as lesões indiretas estão mais associadas à radiação de baixo LET [39].

A RBE quantifica e compara as lesões biológicas provocadas por diferentes tipos de radiação [39]. Quantitativamente, é o rácio entre a dose absorvida de uma radiação de referência e a dose absorvida do tipo de radiação de interesse, de forma que ambas produzam o mesmo nível de efeito biológico [39]. A dose absorvida é a quantidade de energia de radiação

ionizante depositada por unidade de massa da substância irradiada e a sua unidade SI (sistema internacional) é o *gray* (Gy), sendo que 1 Gy equivale a 1 joule de energia depositada por quilograma de material irradiado [43].

Por último, a OER descreve a influência do efeito do oxigénio. É definida como o rácio das doses de radiação que produzem o mesmo efeito biológico em condições de hipoxia (baixos níveis de oxigénio) e em condições aeróbicas (bem oxigenadas) [39]. De facto, a resposta dos tecidos biológicos à radiação é maior quando são irradiados em situação aeróbica do que em condições de hipoxia, uma vez que o oxigénio é necessário para a formação de radicais livres durante a radiólise da água [39].

1.2.3 Lesões no DNA

O DNA é a região mais radiossensível da célula. Lesões nesta molécula aumentam a probabilidade de ocorrência de mutações génicas e de desenvolvimento de cancro, mas, por outro lado, a indução destas lesões através do uso de agentes químicos ou de radiação ionizante pode levar à morte das células tumorais [47].

As mutações em genes relacionados com a reparação do DNA aumentam a sensibilidade à quimioterapia/radioterapia, pelo que, o uso de inibidores específicos que visem enzimas envolvidas nas vias de reparação do DNA é uma forma eficaz de induzir letalidade sintética com quimioterapia/radioterapia no tratamento do cancro [47]. O conceito de letalidade sintética descreve uma situação em que a mutação simultânea de dois genes resulta na morte celular, enquanto que a mutação individual de cada um é compatível com a viabilidade celular [48]. Neste contexto, a letalidade sintética envolve a interrupção simultânea de vias de reparação do DNA, pelo que a utilização de um inibidor em células com uma via de reparação deficiente, devido à mutação de genes que codificam proteínas essenciais para essa via, levará à morte celular.

As lesões induzidas pela radiação ionizante na molécula do DNA compreendem modificações de bases azotadas ou açúcares, interações DNA-proteínas, ligações cruzadas, quebras de cadeia simples (SSBs, do inglês *single-strand breaks*) e quebras de cadeia dupla (DSBs, do inglês *double-strand breaks*) (**Figura 5**) [39].

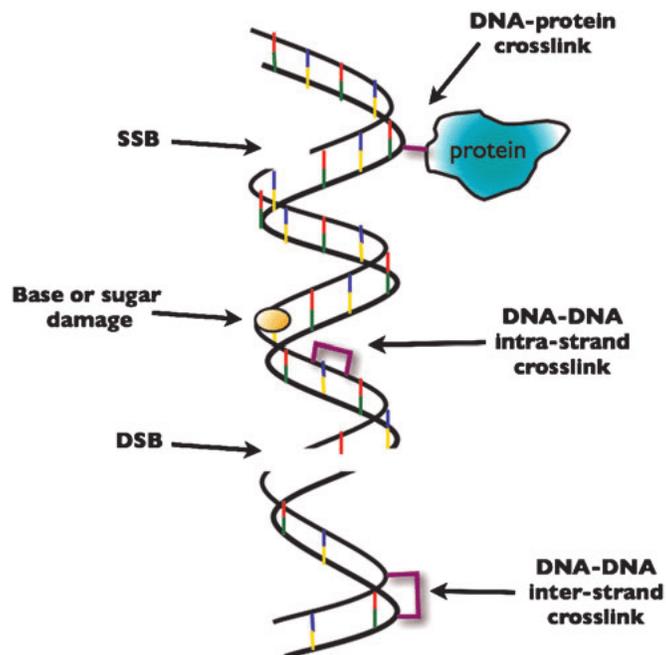


Figura 5: Esquema representativo das lesões induzidas no DNA pela radiação ionizante. Estas lesões incluem modificações de bases azotadas ou açúcares, interações DNA-proteínas, ligações cruzadas, quebras de cadeia simples (SSBs) e quebras de cadeia dupla (DSBs). Retirado de: [49]. Autorização de *copyright* no anexo I.

As SSBs, que envolvem a quebra de apenas uma cadeia do DNA, são o tipo mais comum de lesão no DNA e podem resultar de processos endógenos ou da exposição a agentes exógenos, como a radiação ionizante ou agentes químicos [39]. A radiação ionizante cria espécies radiculares altamente reativas que podem reagir com o DNA e produzir uma SSB [39]. A reparação deste tipo de lesão é relativamente simples, pois as células têm mecanismos de reparação eficazes para as corrigir, uma vez que as bases azotadas são complementares uma à outra, servindo a cadeia oposta como molde para reparação da cadeia lesada [39]. Os raios-X, que apresentam baixo LET, induzem quebras espaçadas e maioritariamente SSBs no DNA [50].

As DSBs são consideradas o tipo de lesão no DNA mais letal e a causa mais significativa de morte celular após a exposição à radiação ionizante, uma vez que causam problemas durante a segregação dos cromossomas na mitose [39,43]. Estas são caracterizadas pela ocorrência de SSBs próximas nas duas cadeias do DNA [39,43]. As DSBs induzidas pela radiação aumentam linearmente com a dose de radiação até várias centenas de Gy [39]. A radiação ionizante de alto LET provoca DSBs próximas nas cadeias do DNA e, consequentemente, lesões substanciais e maioritariamente letais [50].

1.2.4 Radioterapia externa

A radioterapia é uma modalidade de tratamento loco-regional do cancro, ou seja, é uma abordagem terapêutica que se foca especificamente na região onde se encontra o tumor [39,43]. Atualmente, é considerada um dos tratamentos mais eficazes para o cancro, sendo incluída no plano de tratamentos da grande maioria dos doentes com esta doença [39,43].

Esta modalidade terapêutica baseia-se na deposição de energia nos tecidos, danificando a estrutura do DNA das células e levando à sua morte, caso a lesão não seja possível de reparar [39]. Inevitavelmente, este processo afeta tanto as células tumorais como as células saudáveis, pelo que, no planeamento do tratamento com radioterapia é necessário um equilíbrio entre o benefício e o risco [39]. O objetivo da radioterapia é o controlo do tumor preservando os tecidos saudáveis, de forma a garantir a cura do doente minimizando os efeitos secundários [39]. Um dos princípios que tem em conta o risco/benefício é o princípio do fracionamento da dose, uma vez que, as lesões no DNA são mais eficientemente reparadas pelas células saudáveis que pelas células tumorais [39]. Assim, a dose total necessária para controlar o tumor é administrada em pequenas frações diárias, para que o intervalo de tempo entre frações permita a reparação das lesões no DNA nas células saudáveis, mas não, ou em menor grau, nas células tumorais [39].

A radioterapia divide-se em três grupos, de acordo com a forma como a radiação é entregue: a radioterapia externa, a radioterapia interna (braquiterapia) e a terapia com radionuclídeos. A radioterapia externa faz uso de uma fonte externa de radiação de alta energia, que é produzida por um acelerador linear, direcionada ao local do tumor. Na braquiterapia as fontes radioativas são colocadas no interior ou próximo do tumor [51]. E a terapia com radionuclídeos pressupõe a administração de radiofármacos que contêm um radionuclídeo ligado a uma molécula específica, que permite que o radionuclídeo seja direcionado para o tumor, onde a molécula transportadora é reconhecida, emitindo a radiação nesse local [52].

Os aceleradores lineares (LINACs, do inglês *linear accelerators*) (**Figura 6**) utilizam campos eletromagnéticos de radiofrequência alternados para acelerar partículas carregadas em linha reta [53]. No caso dos raios-X, os LINACs usam microondas para acelerar eletrões que colidem com um alvo metálico de elevado número atómico produzindo raios-X de alta energia [53]. Estes são geralmente modelados por um colimador multifolha (MLC, do inglês *multileaf*

collimator) que é incorporado na *gantry*, para se adaptarem à forma do tumor, minimizando a irradiação dos tecidos normais envolventes [53]. O feixe de raios-X sai da *gantry*, que é uma estrutura capaz de girar 360° em torno do doente. Os doentes são deitados numa maca móvel e é utilizado um sistema de lasers para garantir o posicionamento correto do doente. Assim, mudando a posição da *gantry* e da mesa móvel, a radiação pode ser entregue ao tumor em vários ângulos.



Figura 6: Representação de um LINAC utilizado em radioterapia (TrueBeam®). Retirado de: [54].

1.3 Inibidores da PARP

Os inibidores da resposta às lesões no DNA, como os inibidores da poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase (iPARP), têm sido estudados como estratégia terapêutica de vários tipos de cancro.

1.3.1 Vias de reparação do DNA

As vias de reparação do DNA são ativadas para preservar a estabilidade e integridade genética quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA, como a radiação ionizante e os agentes de quimioterapia. Uma vez que as terapias contra o cancro, como a radioterapia e a quimioterapia, induzem a morte celular através de lesões diretas ou indiretas

no DNA, a desregulação das vias de reparação do DNA pode aumentar a sensibilidade do tumor ao tratamento [55].

As vias de reparação do DNA incluem a reparação por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*), a reparação por excisão de nucleótidos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), a reparação de incompatibilidades (MMR, do inglês *mismatch repair*), a recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) (Figura 7) [56].

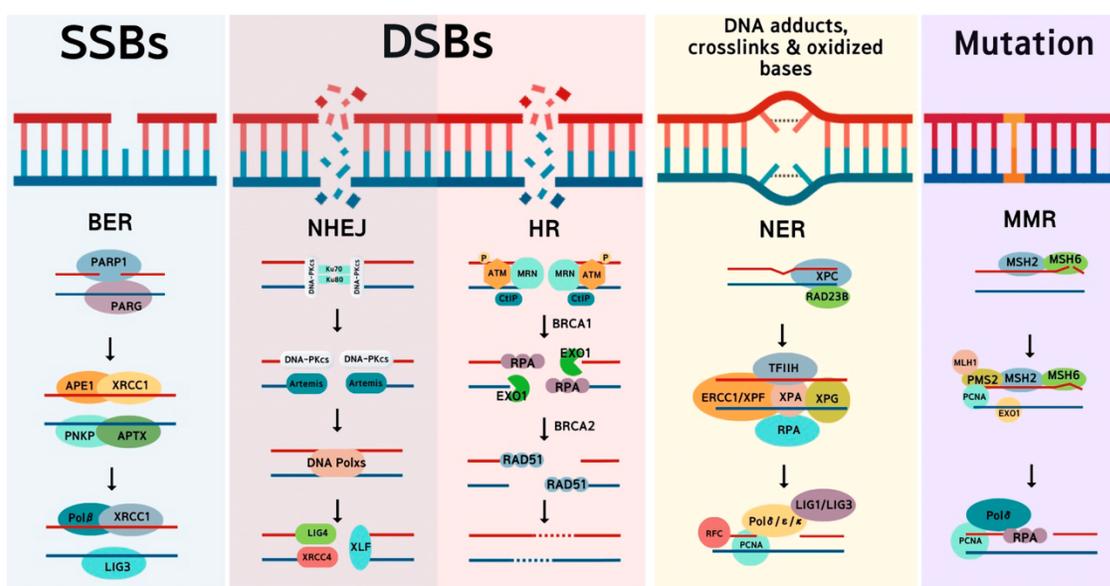


Figura 7: Tipos de lesões no DNA e respectivas vias de reparação. As quebras de cadeia simples (SSBs) ativam a reparação por excisão de bases (BER) e as quebras de cadeia dupla (DSBs) podem ser reparadas pela junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) ou pela recombinação homóloga (HR). Outros tipos de lesões, como aductos de DNA, ligações cruzadas e bases oxidadas, ativam a reparação por excisão de nucleótidos (NER) e uma mutação no DNA, como uma inserção, uma deleção ou um erro de emparelhamento de bases, ativa a reparação de incompatibilidades (MMR). Retirado de: [56].

A BER é uma via de reparação de lesões nas bases do DNA, sendo responsável pela reparação das SSBs. Após identificar a lesão, esta via atua através da remoção da base lesada por uma DNA-glicosilase e uma endonuclease corta a molécula de DNA no local da lesão. Depois ocorre a síntese e a inserção da nova base através da DNA-polimerase e a cadeia de DNA é selada pela DNA-ligase [39].

A NER repara lesões que deformam a dupla hélice do DNA, como os aductos de DNA, as ligações cruzadas e as bases oxidadas [56]. O princípio de ação desta via é a identificação da lesão, seguida da remoção do segmento de nucleótidos lesado, da síntese da sequência de nucleótidos de DNA pela DNA-polimerase usando a cadeia complementar como molde e do fecho da cadeia de DNA pela DNA-ligase [56].

A MMR identifica e corrige erros de emparelhamento de bases, de inserções e de deleções que surgem durante a replicação do DNA, garantido a estabilidade genómica. Esta via atua através do reconhecimento e da excisão da lesão, da síntese do DNA correto, do preenchimento da lacuna e do fecho da cadeia de DNA [39].

As DSBs são consideradas o tipo de lesão no DNA mais letal, uma vez que, uma DSB não corrigida pode levar à perda de informação genética e à morte celular. Assim, uma DSB não reparada pode levar à instabilidade genómica e, eventualmente, à tumorigénese. Por outro lado, a indução de DSBs em células tumorais é uma estratégia efetiva para erradicar este tipo de células, podendo constituir uma abordagem terapêutica para o cancro. As duas principais vias envolvidas na reparação das DSBs são a HR e a NHEJ [39].

A HR atua durante o ciclo celular, nomeadamente, no fim da fase S e em G2 e corrige lesões no DNA com elevada precisão, uma vez que utiliza o cromátídeo-irmão não danificado como molde para reparar as DSBs, não apresentando erros. Depois do reconhecimento da lesão, ocorre a ressecção das extremidades do DNA, no local de quebra, criando uma região de DNA de cadeia simples exposta. De seguida, a proteína Rad51 é recrutada e forma um filamento nucleoproteico em torno das extremidades, que procura a sequência homóloga no cromátídeo-irmão e promove a restauração da sequência de DNA danificada. Após a síntese do DNA, as extremidades são ligadas e a dupla hélice restabelecida [39,56].

A NHEJ opera através da remoção do DNA danificado seguida da ligação direta, podendo ocorrer a inserção ou a deleção de bases e, por isso, é propensa a erros. No entanto, tem a capacidade de reparar DSBs independentemente da fase do ciclo celular em que a célula se encontra, sendo mais significativa na fase G1. Nesta via, o Ku, um heterodímero composto pelas proteínas Ku70 e Ku80, reconhece a DSB e une as extremidades livres do DNA no local da quebra, protegendo-as da digestão por nucleases [39,56].

1.3.2 PARP

A poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase (PARP) é uma família de enzimas nucleares que desempenha um papel fundamental na reparação de lesões no DNA e na manutenção da integridade do genoma. O membro mais reconhecido e melhor caracterizado é a PARP1, que atua nas vias de reparação do DNA [57]. A constatação de que lesões no DNA induzidas por agentes exógenos, como a radiação ionizante, causam um aumento da atividade da PARP1 evidencia o importante papel desta proteína na reparação do DNA [58].

Este papel desempenhado pela PARP1 ocorre especialmente na reparação de SSBs, através do seu envolvimento na reparação por excisão de bases. Esta enzima deteta e liga-se às SSBs através do domínio de ligação ao DNA, e em seguida, sintetiza a poli (ADP-ribose) (PAR) e transfere-a para proteínas aceitadoras, através da clivagem do NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida e adenina), com conseqüente libertação de nicotinamida, processo denominado por PARilação. A PAR, ligada covalentemente às proteínas aceitadoras, incluindo a PARP1, histonas e outras proteínas de reparação do DNA, formam polímeros altamente carregados negativamente adjacentes às quebras do DNA, que recrutam outras proteínas para o local da lesão no DNA, facilitando a sua reparação [57,59–61].

Apesar da sua função amplamente conhecida na reparação por excisão de bases, há evidências de que a PARP1 também atua na reparação de DSBs através do recrutamento de enzimas de reparação na HR, como a Rad51, e da inativação de proteínas quinases dependentes de DNA na NHEJ [59,62].

1.3.3 Inibidores da PARP

A investigação na área do tratamento do cancro evoluiu no sentido de encontrar estratégias capazes de aumentar a eficácia dos tratamentos. A descoberta da PARP, e da sua função nas vias de reparação do DNA, proporcionou o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antineoplásicos – os inibidores da PARP (iPARP), cujo grupo farmacoterapêutico é “Outros medicamentos antineoplásicos”, código ATC: L01XK01 [63,64].

Os iPARP inibem a atividade enzimática da PARP através de dois mecanismos: a inibição catalítica da PARP ou o aprisionamento da PARP na molécula de DNA. A inibição catalítica da PARP ocorre por competição do inibidor com o NAD⁺ pelo local cataliticamente ativo da

enzima e o aprisionamento da PARP no DNA acontece através da ligação do inibidor à enzima no local da lesão, aprisionando-a e impedindo-a de realizar a PARilação [57,59,61].

A inibição da PARP resulta na ausência de reparação das SSBs pela reparação por excisão de bases, que consequentemente, origina DSBs (**Figura 8**) [63,65,66]. A incapacidade de reparação de DSBs ou a sua deficiente reparação conduz a uma acumulação de lesões não reparadas no DNA que levam à morte celular. Este efeito é pronunciado em células com defeitos na via de HR devido ao conceito de letalidade sintética, como é o caso de mutações nos genes *BRCA1/2* [63,65,66]. O culminar da inibição da PARP, que conduz à incapacidade de reparação de SSBs, e a perda de função dos genes *BRCA1/2*, sendo que as proteínas *BRCA1/2* desempenham um papel fundamental na HR (**Figura 7**) na reparação de DSBs, é a morte celular (**Figura 8**) [65].

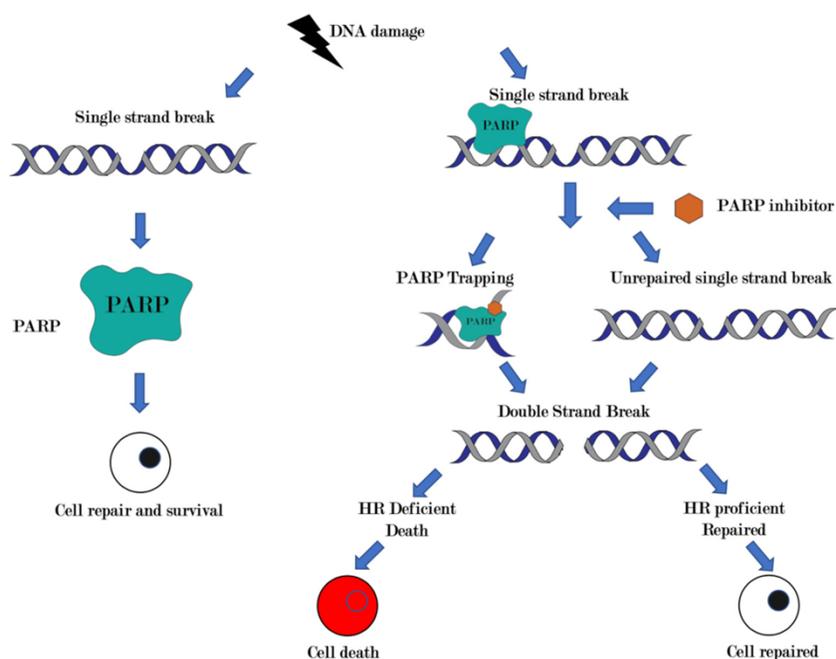


Figura 8: Mecanismo de ação dos inibidores da PARP. A PARP desempenha um papel importante na reparação de lesões no DNA. Os iPARP afetam a reparação por excisão de bases (BER) impedindo a reparação de quebras de cadeia simples (SSBs). A acumulação de SSBs dá origem a quebras de cadeia dupla (DSBs) que, em células deficientes em recombinação homóloga (HR), não são reparadas, conduzindo à morte celular. Retirado de: [67].

1.3.4 Mecanismos de radiosensibilização dos iPARP

Quanto à inibição da reparação do DNA, sabe-se que os iPARP inibem a reparação por excisão de bases e, conseqüentemente, inibem a reparação das SSBs causadas pela radiação ionizante, levando à sua transformação em DSBs, nas células tumorais. Portanto, a acumulação de lesões no DNA e conseqüente morte das células tumorais é o principal efeito radiosensibilizador dos iPARP [65].

A nível celular, a radiosensibilidade das células varia ao longo do ciclo celular, sendo as fases M e G2 as mais radiosensíveis, enquanto as zonas média e tardia da fase S são mais riorresistentes. Os iPARP conseguem reter as células tumorais nas fases mais sensíveis à radiação e exercem um efeito radiosensibilizador na fase S operando, desta maneira, sinergicamente com a radioterapia [65].

Em relação ao tecido, sabe-se que o efeito da radiação ionizante depende do nível de oxigênio tecidual. Os tumores sólidos são heterogêneos com regiões hipóxicas que contribuem para a resistência à radiação. No entanto, vários iPARP têm a capacidade de induzir a vasodilatação e de aumentar a perfusão do tumor tornando-os, por esta via, mais sensíveis à radiação [65].

Por último, os iPARP inibem a remodelação da cromatina, pois têm a capacidade de atrasar a abertura da dupla cadeia do DNA e, conseqüentemente, a sua reparação, favorecendo as lesões no DNA causadas pela radioterapia [68].

Um agente radiosensibilizador deve ter o potencial de sensibilizar as células à radiação ionizante evitando o aumento da toxicidade nas células saudáveis. Os iPARP têm ganho muito interesse na investigação por possuírem a maioria das qualidades necessárias para serem bons agentes radiosensibilizadores [39].

1.3.5 Tipos de inibidores da PARP

O primeiro iPARP aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA) foi o olaparib (**Tabela 2**), em 2014, como monoterapia para o tratamento do cancro do ovário avançado com mutações na linha germinativa *BRCA1/2*. Em 2017, foi aprovado para o tratamento dos carcinomas recorrentes do ovário, das trompas de Falópio e peritoneal primário, independentemente do *status* da mutação *BRCA1/2*.

Posteriormente, foi também aprovado para o tratamento do cancro da mama HER2-negativo com mutação na linha germinativa *BRCA1/2* e do cancro do pâncreas metastático com a mesma mutação, em 2018 e 2019, respetivamente. Mais recentemente, no início de 2020, o olaparib foi aprovado para o tratamento do cancro da próstata metastático resistente à castração com mutações em genes que intervêm na HR [57].

Posteriormente, vários outros iPARP foram aprovados para a utilização na prática clínica como o rucaparib, o niraparib e o talazoparib (**Tabela 2**) [57].

O rucaparib foi inicialmente aprovado, em 2016, para o tratamento do carcinoma do ovário avançado com mutação germinativa ou somática *BRCA1/2*, após tratamentos de quimioterapia. Em 2018, foi aprovada a terapia de manutenção do rucaparib para os carcinomas recorrentes do ovário, das trompas de Falópio e peritoneal primário, independentemente do *status* da mutação *BRCA1/2*. Já em 2020, o rucaparib ganhou a aprovação para o tratamento do cancro da próstata metastático resistente à castração com mutação *BRCA1/2* [57].

O niraparib foi aprovado pela primeira vez em 2017 para o tratamento de manutenção dos carcinomas recorrentes do ovário, das trompas de Falópio e peritoneal primário, independentemente do *status* da mutação *BRCA1/2*, que mostraram uma resposta completa ou parcial à quimioterapia. Em 2019, o uso do niraparib foi alargado para o tratamento de última linha dos carcinomas anteriormente referidos, com mutações em genes que intervêm na HR, independentemente da resposta à quimioterapia. Finalmente, em 2020, o uso do niraparib foi novamente alargado para o tratamento dos carcinomas anteriores com resposta à quimioterapia, independentemente do *status* das mutações em genes que intervêm na HR [57].

Por último, o talazoparib foi aprovado, em 2018, para o tratamento do cancro da mama HER2-negativo avançado ou metastático, com mutação na linha germinativa *BRCA1/2* [57].

Tabela 2: Histórico de aprovação dos iPARP pela FDA e EMA. Retirado de: [57].

PARP inhibitor	Approving organization	Year of approval	Indication	Mutational requirement	Relevant studies
Olaparib	FDA and EMA	2014	Advanced ovarian carcinoma	Germline BRCA1/2 Mutation	NCT0107662 (Kaufman et al., 2015)
	FDA and EMA	2017	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Independent of BRCA1/2 Mutational Status	SOLO-2 (Pujade-Lauraine et al., 2017) and Study 19 (Friedlander et al., 2018)
	FDA EMA	2018 2019	HER-2 negative breast cancer	BRCA1/2 Mutated	OlympiAD (Robson et al., 2017)
	FDA EMA	2018 2019	First-line treatment of advanced ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Germline BRCA1/2 Mutation Complete or partial chemotherapy response.	SOLO-1 (Moore et al., 2018)
	FDA	2019	Metastatic pancreatic cancer	BRCA1/2 Mutated	POLO (Golan et al., 2019)
	FDA	2020	First-line treatment of advanced ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma in combination with Bevacizumab	HRD-Positive Complete or partial chemotherapy response.	PAOLA-1 (Ray-Coquard et al., 2019)
	FDA	2020	Metastatic castration-resistant prostate cancer	HRD-positive	PROfound (de Bono et al., 2020)
	Rucaparib	FDA EMA	2016 2018	Advanced ovarian carcinomas, following multiple chemotherapy treatments	BRCA1/2 Mutated
FDA EMA		2018 2019	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Independent of BRCA1/2 Mutational Status	ARIEL3 (Coleman et al., 2017)
FDA		2020	Metastatic castration-resistant prostate cancer	BRCA1/2 Mutated	TRITON2 (Abida et al., 2019)
Niraparib		FDA and EMA	2017	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Complete or partial chemotherapy response.
	FDA	2019	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	HRD-positive Independent of chemotherapy response	QUADRA Study (Moore et al., 2019)
	FDA and EMA	2020	Advanced ovarian carcinomas and primary peritoneal carcinoma	Independent of biomarker status Complete or partial chemotherapy response.	PRIMA Study (Gonzalez-Martin et al., 2019)
Talazoparib	FDA and EMA	2018	Advanced or metastatic HER2-negative breast cancer	Germline BRCA1/2 Mutated	EMBRACA Study (Ettl et al., 2018)

Um quinto iPARP, o veliparib, está atualmente a ser submetido a ensaios clínicos, não estando ainda aprovada a sua utilização na prática clínica [57].

As diferenças entre os vários iPARP residem na potência dos mecanismos de ação como a inibição catalítica da PARP e o aprisionamento da PARP na molécula do DNA (**Tabela 3**) [69].

Tabela 3: Representação dos iPARP aprovados pela FDA e EMA e respectivas diferenças nos mecanismos de ação. Retirado de: [69].

	Brand name	Manufacture	Mechanism of action	
			Catalytic inhibition (PARP1)*	Trapping*
Niraparib	ZEJULA	Merck/Tesaro/GSK	Yes (+)	Yes (3X)
Olaparib	LYNPARZA	KuDOS Pharmaceutical/AstraZeneca	Yes (++)	Yes (1X)
Rucaparib	RUBRACA	Agouron Pharmaceuticals/Clovis Oncology	Yes (+++)	Yes (1X)
Talazoparib	TALENNA	LEAD Therapeutics/Pfizer	Yes (++++)	Yes (100X)

Notes: “+” signs indicate the qualitative potency of inhibiting the enzymatic activity of PARP1. “1X, 3X, and 100X” indicates the relative potency of trapping PARP1 on DNA.

*Rudolph, J.; Jung, K.; Luger, K., Inhibitors of PARP: Number crunching and structure gazing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2022**, *119* (11), e2121979119.

Atualmente, o único iPARP aprovado para o cancro do pâncreas é o olaparib e a sua aprovação foi baseada no ensaio clínico POLO fase III [70]. Este foi um ensaio que teve como intuito avaliar a eficácia do olaparib como terapia de manutenção em doentes com cancro do pâncreas metastático com mutações *BRCA1/2*, cuja doença tenha permanecido estável após 16 semanas de quimioterapia à base de platina [70,71]. Neste estudo foram incluídos 154 doentes onde, após a quimioterapia, 92 receberam olaparib (300 mg duas vezes ao dia), enquanto os restantes receberam um placebo [70]. Entre todos os doentes que receberam olaparib, 32% apresentava mutações na linha germinativa *BRCA1*, 67% na linha germinativa *BRCA2* e apenas 1% carregava mutações em ambos os genes [70]. Depois de 2 anos de tratamento, verificou-se que o olaparib impediu a progressão da doença em 22,1% dos doentes que receberam o tratamento enquanto apenas 9,6% dos doentes que receberam placebo não tiveram progressão da doença. Assim concluiu-se que os doentes com cancro do pâncreas metastático com mutações *BRCA1/2* que receberam olaparib tiveram uma sobrevida livre de progressão mais longa do que os que receberam placebo [70].

1.3.6 Resistência aos iPARP

Embora os iPARP se tenham mostrado promissores para o tratamento do cancro como monoterapia ou em combinação com outras terapias, tem-se observado a aquisição de resistência por parte das células tumorais [62].

Foram propostos vários mecanismos de resistência que explicam de que forma as células tumorais deixam de responder aos efeitos dos iPARP, entre eles, o mecanismo mais amplamente reconhecido é a restauração da via de HR [57]. Através da restauração desta via, as DSBs podem ser efetivamente reparadas pelo que não ocorre a morte pretendida das células tumorais [57]. Os mecanismos de restauração desta via incluem mutações secundárias que restauram os genes *BRCA1/2*, a expressão de variantes hipomórficas *BRCA1/2* e as alterações epigenéticas nos genes envolvidos na HR [63].

Outros mecanismos relacionados ao aparecimento de resistência aos iPARP incluem a estabilização do garfo de replicação, que contribui para a reparação de lesões no DNA e consequente sobrevivência das células tumorais, a redução da expressão das enzimas PARP, que leva à redução da atividade do inibidor e à redução do aprisionamento da PARP e o efluxo do fármaco, que reduz a disponibilidade do mesmo, e, consequentemente, diminui o seu efeito [63].

2. Objetivos

O cancro do pâncreas é um tumor muito agressivo e difícil de tratar, apresentando-se como um dos tipos de tumores mais letal a nível mundial. O prognóstico deste tipo de tumor não tem sofrido melhorias significativas, sendo a taxa de sobrevivência a 5 anos muito baixa. Isto deve-se sobretudo à dificuldade de diagnóstico precoce, devido à sua progressão sem sintomas, e à falta de opções terapêuticas eficazes, uma vez que a única terapia potencialmente curativa é a cirurgia, a qual se restringe a uma fase inicial da doença em que o tumor é ressecável. Desta maneira, há a necessidade urgente de se descobrirem novas opções terapêuticas mais eficazes.

A radioterapia é um dos tipos de tratamento do cancro mais utilizados, onde feixes de radiação ionizante são direcionados para o local do tumor causando a morte das células tumorais. Os iPARP têm sido estudados como uma estratégia terapêutica para o tratamento de vários tipos de cancro. Relativamente ao cancro do pâncreas, neste momento, apenas está aprovado o olaparib para o tratamento do cancro metastático em doentes com mutação na linha germinativa *BRCA1/2*, cuja doença tenha permanecido estável após 16 semanas de quimioterapia à base de platina [71].

A combinação da radioterapia com um inibidor da PARP parece muito promissora, uma vez que as SSBs induzidas pelo tratamento com radioterapia não vão ser reparadas devido à inibição da PARP, originando DSBs. Desta maneira, esta combinação induzirá uma acumulação de lesões no DNA, que podem sobrecarregar os mecanismos de reparação das células tumorais levando-as à morte.

O principal objetivo deste projeto é aumentar a atividade antitumoral da radioterapia com raios-X através da sua combinação com o inibidor da PARP, o olaparib, de forma a aferir se esta combinação possui um efeito sinérgico, a fim de encontrar uma melhor abordagem terapêutica para o tratamento do cancro do pâncreas.

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentados de forma descritiva todos os materiais e metodologias utilizadas ao longo deste projeto.

Primeiramente, estudaram-se os efeitos da radioterapia e do inibidor da PARP em regime de monoterapia em células de adenocarcinoma pancreático, em termos de sobrevivência celular, a fim de estabelecer um racional para a sua combinação. Posteriormente, estudou-se o efeito da combinação da radioterapia com o inibidor da PARP, também em termos de sobrevivência celular, de forma a avaliar o efeito sinérgico desta combinação para o tratamento do cancro do pâncreas.

Numa segunda fase, avaliaram-se os efeitos dos tratamentos em monoterapia e em combinação a nível do DNA, através da avaliação da genotoxicidade e da análise e quantificação de *foci* dos marcadores de DSBs, γ -H2AX e 53BP1.

3.1 Cultura celular

A cultura celular é o método utilizado para estudar o comportamento de células *in vitro*, consistindo no isolamento de células de um organismo e a sua subsequente propagação e cultivo em condições artificiais apropriadas, em suspensão ou aderentes em monocamada [72].

Neste projeto foram utilizadas duas linhas celulares humanas de cancro do pâncreas, a PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) e a Hs 766T (ATCC® HTB-134™), adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC®). A PANC-1 é uma linha celular com fenótipo mesenquimatoso [73–75], derivada de um adenocarcinoma ductal pancreático humano, com origem numa amostra de tecido tumoral obtida após uma pancreatoduodenectomia a homem caucasiano de 56 anos de idade [76,77]. O tumor originário era uma lesão nodular na cabeça do pâncreas, que invadiu a parede do duodeno e que microscopicamente se tratava de um carcinoma indiferenciado [77]. As células desta linha celular são aderentes aos frascos de cultura e possuem mutações nos genes *KRAS* e *TP53* [78,79]. Relativamente à linha celular Hs 766T, esta foi derivada da metástase de gânglio linfático de um homem caucasiano de 65 anos com carcinoma pancreático [80]. Segundo a literatura, apesar de Ikenaga *et al.* reportarem que esta linha celular apresenta um fenótipo epitelial [81], Sinha *et al.* e Maupin *et al.* relatam que são mesenquimatosas [74,82]. Além disso, também crescem em monocamada aderente e contêm

mutação no gene *KRAS*, no entanto, não apresentam mutação no gene *TP53* [83]. Na **Figura 9** é possível observar a morfologia destas duas linhas celulares.

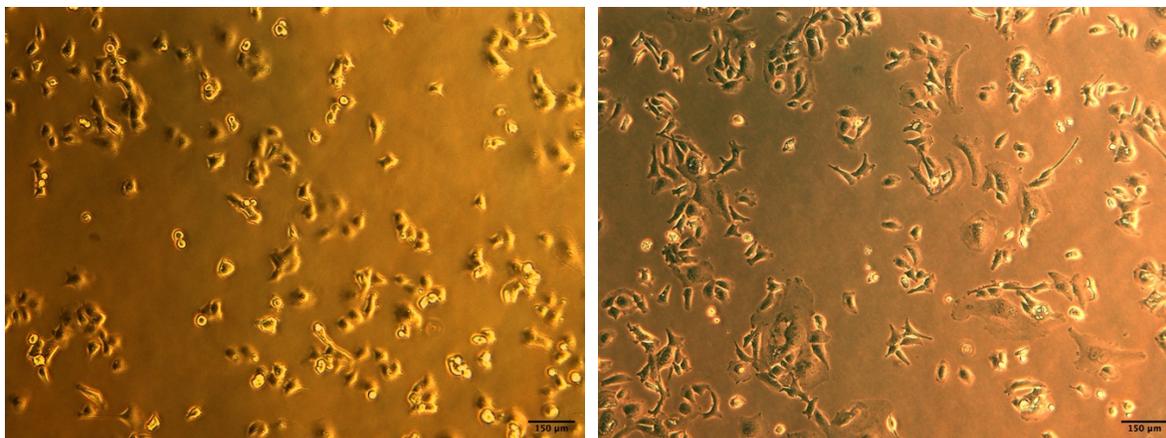


Figura 9: Imagens das células PANC-1 (esquerda) e Hs 766T (direita), adquiridas num microscópio ótico invertido, com uma ampliação de 100 vezes.

Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648) suplementado com 1% de antibiótico (Sigma, A5955), 0,25 mM de piruvato de sódio (Sigma, S8636) e 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Gibco, A5256701), a pH 7,4, em frascos de cultura estéreis, aderentes e ventilados. O meio de cultura fornece às células nutrientes, fatores de crescimento, hormonas e um ambiente físico-químico regulado, permitindo a sua propagação [84]. As células foram mantidas numa incubadora (Binder®, Alemanha) com uma atmosfera humidificada, à temperatura de 37°C com 5% de CO₂. Durante todo o período em que as células se mantiveram em cultura, o meio de cultura foi renovado entre duas a três vezes por semana, uma vez que as células consomem os nutrientes do meio e libertam metabólitos ácidos, que diminuem o pH do meio. É também importante referir que as células foram submetidas a análises regulares à contaminação por micoplasma, que deteta a presença de microorganismos de tamanho reduzido não visíveis ao microscópio, que afetam a fisiologia da linha celular e dão origem a dados incorretos [85]. Da mesma forma, ambas as linhas celulares foram autenticadas recorrendo à análise do seu perfil STR (do inglês, *short tandem repeat*), de forma a confirmar a sua autenticidade, no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Uma vez que as células utilizadas neste estudo crescem em monocamada aderente, para a realização da subcultura e dos respectivos ensaios foi necessário destacá-las do frasco de cultura. Para isso, os frascos foram observados no microscópio ótico invertido (Motic AE31) e quando apresentavam cerca de 80-90% de confluência procedeu-se ao seu destacamento, recorrendo a um agente de dissociação enzimática, uma solução de tripsina-EDTA (Sigma, T4049). Para tal, aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com cerca de 5 mL de uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) a pH 7,4, para eliminar vestígios de meio de cultura, uma vez que, o FBS presente no meio pode inativar a função da solução de dissociação. De seguida, aspirou-se o PBS e incubaram-se as células com 2 mL da solução de tripsina-EDTA, durante cerca de 5 minutos, nunca ultrapassando o tempo máximo de 10 minutos. Ao fim desse tempo, observaram-se os frascos ao microscópio, de forma a confirmar o destacamento das células e procedeu-se à inativação da tripsina, através da adição de, pelo menos, 4 mL de meio de cultura. Homogeneizou-se a solução, de forma a eliminar possíveis agregados de células e, no caso da subcultura, a suspensão celular foi dividida pelo número de frascos necessários, com conseqüente adição de meio de cultura, enquanto que para a realização dos ensaios, se procedeu à determinação da concentração celular da suspensão.

Para a determinação da concentração celular utilizou-se o método de exclusão do azul de tripano, que permite identificar e quantificar as células viáveis e não viáveis de uma suspensão celular. Este método baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas, pelo que não permitem a entrada do corante, enquanto que as membranas das células mortas são permeáveis ao azul de tripano. Desta maneira, quando observadas ao microscópio, as células viáveis apresentam-se brilhantes e as células não viáveis exibem uma coloração azul [86]. Assim, para a quantificação das células viáveis, uma suspensão de células é misturada com azul de tripano numa proporção de 1:1. De seguida, essa mistura é colocada numa câmara de *Neubauer* e as células viáveis dos quatro quadrantes (Q₁, Q₂, Q₃ e Q₄) são contadas com recurso ao microscópio ótico invertido, numa ampliação de 100 vezes (**Figura 10**). Finalmente, a concentração celular é calculada com base na **Equação 1**.

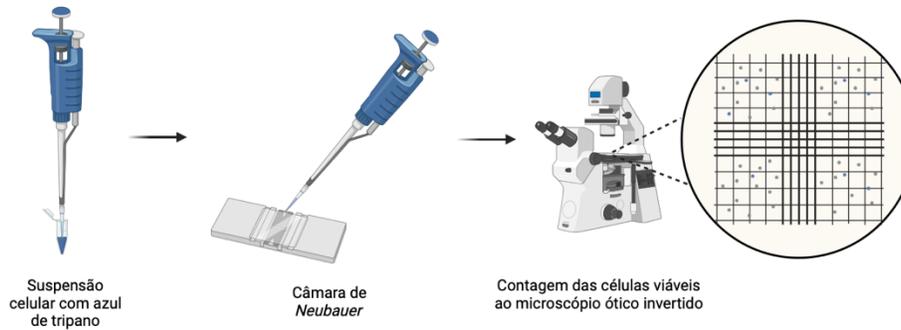


Figura 10: Representação esquemática do procedimento de contagem celular.

$$\text{Concentração celular (células/mL)} = \frac{(Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4)}{4} \times 2 \times 10\,000$$

Equação 1: Fórmula utilizada para o cálculo da concentração celular.

3.2 Tempo de duplicação

O ciclo de crescimento das células utilizadas neste estudo pode ser dividido em três fases: a fase de latência, a fase exponencial e a fase estacionária [87]. A fase de latência é um período de adaptação ao novo ambiente e preparação para a divisão celular após a subcultura, durante o qual ainda não ocorrem divisões celulares [87]. Nesta fase, as células substituem elementos da superfície celular e da matriz extracelular perdidos durante o destacamento do frasco de cultura e fixam-se ao novo substrato [87]. A fase exponencial é o período em que as células se começam a dividir rapidamente e ocorre um aumento exponencial do número de células, que se segue à fase de latência e termina quando a confluência é atingida [87]. Neste período, a taxa de crescimento é máxima e constante. Já a fase estacionária é atingida no final da fase exponencial, quando a cultura se torna confluenta, o que significa que toda a superfície de crescimento disponível está ocupada e todas as células estão em contacto com outras células circundantes [87]. Nesta fase, a taxa de crescimento desacelera e, em alguns casos a proliferação celular cessa completamente [87].

A construção de uma curva de crescimento a partir de contagens periódicas das células vivas permite a determinação de parâmetros que caracterizam as linhas celulares em estudo [87], como é o caso do tempo de duplicação (DT, do inglês *doubling time*), que corresponde

ao tempo médio que uma população de células demora a duplicar, ou seja, a completar uma divisão celular [88]. Além disso, a identificação do tempo de duplicação também permitiu a obtenção do período de incubação ideal das células para o ensaio clonogénico, uma vez que este tempo deve ser equivalente a pelo menos 6 divisões celulares para se obterem colónias visíveis a olho nu [89].

Para a obtenção das curvas de crescimento e consequente determinação do tempo de duplicação, semearam-se 240 000 células/frasco em frascos de cultura de 25 cm² (SPL Life Sciences 70025), em duplicado. Este valor foi otimizado tendo sido testados outros números de células semeadas por frasco. Os frascos foram incubados e as células vivas foram contadas 24h, 48h, 72h e 96h após terem sido semeadas. Para isso, as células foram destacadas e a suspensão celular foi centrifugada a 1300 xG durante 5 minutos. De seguida, descartou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o *pellet* em 0,5 mL (para o caso da contagem às 24h e 48h) ou 1 mL (para o caso da contagem às 72h e 96h) de PBS e retiraram-se 20 µL da suspensão para um microtubo, ao qual, foram adicionados 20 µL de azul de tripano. Finalmente determinou-se o número de células vivas em cada frasco através do método de exclusão do azul de tripano, já descrito na **Secção 3.1**. A experiência foi realizada 3 vezes em duplicado para se obter uma maior significância estatística.

3.2.1 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa *GraphPad Prism* 9.5.0, (*Macintosh Version by Software MacKiev* © 1994-2022 *GraphPad Software, LLC*).

Para a obtenção das curvas de crescimento e determinação do tempo de duplicação, ajustaram-se os valores das contagens diárias das células vivas em função do tempo a um modelo de crescimento exponencial (**Equação 2**) [87]. Desta maneira, foi possível obter o valor do tempo de duplicação (**Equação 3**), assim como a sua respetiva incerteza (**Equação 4**) para ambas as linhas celulares utilizadas. Para a determinação do tempo de incubação ideal para o ensaio clonogénico multiplicou-se o valor obtido do tempo de duplicação por seis e dividiu-se por 24h para se obter o resultado em dias.

$$y = y_0 e^{kx}$$

Equação 2: Equação de crescimento exponencial, onde y representa o número de células vivas num determinado período de tempo x , y_0 é o número inicial de células vivas quando $x=0$, k representa a taxa de crescimento da população e x o tempo.

$$DT = \frac{\ln(2)}{k}$$

Equação 3: Expressão utilizada para calcular o tempo de duplicação (DT).

$$\sigma_{DT} = \frac{dDT}{dk} = \frac{\ln(2)}{k^2} \sigma_k$$

Equação 4: Expressão utilizada para calcular a incerteza associada ao tempo de duplicação (DT).

3.3 Tratamentos

3.3.1 Radioterapia

As linhas celulares foram irradiadas com raios-X com energia de 6 MV, num acelerador linear TrueBeam® (Varian, 5219), no serviço de radioterapia da Unidade Local de Saúde (ULS) de Coimbra, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

Para a irradiação das células, preparou-se uma suspensão celular com a concentração de 500 000 células/mL, que foi distribuída por microtubos de 0,5 mL. O número de microtubos dependeu do número de condições da experiência, sendo que um era para o controlo e um para cada dose de radiação considerada na experiência. Os microtubos foram cheios até ao limite e fechados de maneira a não ficar ar no seu interior, uma vez que durante o processo de irradiação a presença de ar influencia a distribuição da dose [90]. Posteriormente, os microtubos foram identificados com a respetiva linha celular e cada uma das condições de irradiação. Para o transporte dos microtubos até ao local de irradiação, estes foram colocados em sacos de plástico, devidamente fechados e identificados, sendo posteriormente colocados

dentro de uma caixa de esferovite. Além dos microtubos com as células foi também necessário preparar um garrafão com água a 37°C.

No local de irradiação, preparou-se o fantoma de acrílico com paredes de 1 cm de espessura na mesa de tratamento, colocando a água a 37°C no interior do fantoma, até cerca de 2 cm acima da marca horizontal, e dispendo os sacos dos microtubos dentro do plástico da estrutura, por ordem decrescente de dose (**Figura 11**). Deste processo apenas se excluíram os microtubos de controlo, que não foram submetidos à irradiação e, por isso, permaneceram na caixa de esferovite, no exterior da sala. A água a 37°C é utilizada no fantoma para facilitar os cálculos dosimétricos, uma vez que tem uma densidade e temperatura semelhantes às dos tecidos humanos. Após a preparação do fantoma, foi ainda necessário alinhar a sua posição com a orientação dos lasers, através da movimentação da mesa de tratamento.

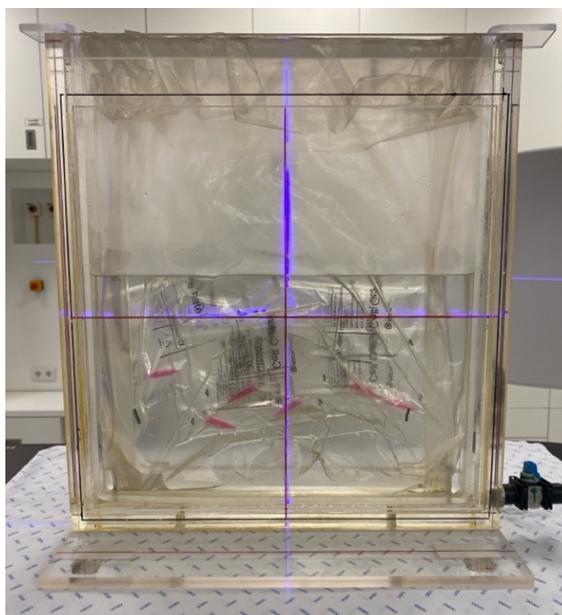


Figura 11: Fantoma utilizado para a irradiação de células.

Para o ensaio de avaliação da sobrevivência celular as células de ambas as linhas foram irradiadas com doses de raios-X de 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy e 8 Gy, de forma cumulativa e em duas posições angulares distintas (90° e 270°), de modo a garantir uma distribuição uniforme de dose em ambos os lados do fantoma. Já para os restantes ensaios a dose de

radiação utilizada foi de 2 Gy em ambas as linhas celulares. A **Figura 12** mostra a configuração final do sistema totalmente montado e alinhado.

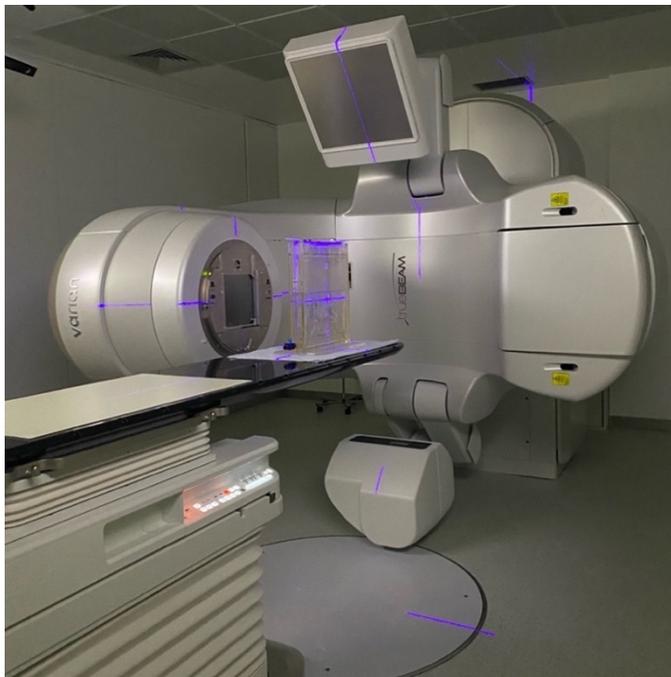


Figura 12: Sistema de irradiação de células composto pelo LINAC TrueBeam® (Varian, 5219) e pelo fantoma de acrílico.

Uma vez fora da sala, definiu-se o esquema de irradiação, convertendo as doses de radiação (Gy) em unidades de monitor (MU, do inglês *monitor units*) do LINAC, que são uma medida utilizada em radioterapia para representar a quantidade de radiação entregue, e procedeu-se à irradiação.

3.3.2 Inibidor da PARP

O inibidor da PARP utilizado neste projeto foi o olaparib (Thermo Fisher Scientific, 466290010). Este foi adquirido na forma de pó cristalino e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente polar e aprótico capaz de dissolver compostos polares e não polares [91], numa concentração de 44 mg/mL. A solução de olaparib foi armazenada a uma temperatura de -80°C e diluída em meio de cultura para a concentração pretendida imediatamente antes da sua utilização.

Para a avaliação da sobrevivência celular do tratamento com olaparib em regime de monoterapia, em ambas as linhas celulares, utilizaram-se as concentrações de 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM e 50 μM de olaparib. Nos seguintes ensaios apenas se utilizou a concentração de 1 μM de olaparib, uma vez que foi a concentração utilizada para o estudo da eficácia do tratamento combinado de olaparib com radioterapia.

3.3.3 Combinação

O tratamento combinado de radioterapia com o inibidor da PARP baseou-se na irradiação das células com as doses apresentadas em 3.3.1 relativas a cada um dos ensaios, seguida da administração de uma concentração fixa de 1 μM de olaparib, imediatamente após as células terem sido semeadas. A concentração de olaparib utilizada foi escolhida tendo em conta que, segundo vários estudos da literatura, esta concentração é suficiente para inibir a PARP sem induzir citotoxicidade significativa em monoterapia [92–94].

3.4 Avaliação da sobrevivência celular

O ensaio clonogénico é o método mais adequado para avaliar os efeitos da radiação ionizante nas células, mas também pode ser utilizado para determinar a eficácia de fármacos [95]. Este ensaio avalia a sobrevivência celular *in vitro* e baseia-se no facto de uma célula sobrevivente ser capaz de se dividir até formar uma colónia composta por, pelo menos, 50 células [95]. Depois de sujeitas a algum tipo de tratamento é expectável que apenas uma fração das células mantenha a capacidade de divisão de modo a formar colónias, pelo que, a sobrevivência celular está relacionada com o número de colónias formadas [95]. Assim, este ensaio foi utilizado para determinar os efeitos da radioterapia e do tratamento com olaparib tanto em regime de monoterapia como em regime de combinação, para ambas as linhas celulares.

Para a realização deste ensaio, as células sujeitas aos diferentes tipos de tratamento referidos nas **Secções 3.2.1, 3.3.2 e 3.3.3** foram semeadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences 30006) com meio de cultura, num volume total de 3 mL por poço, tendo sido cada condição realizada em duplicado. Ressalva-se que o número de células utilizado, bem como o período de incubação foi otimizado para cada uma das linhas celulares.

No caso do tratamento com radiação ionizante, o número de células semeadas por poço para cada dose de raios-X e para cada linha celular encontra-se na **Tabela 4**. Para a linha celular PANC-1 foi necessário aumentar o número de células por poço para as doses mais altas para que, no final do ensaio, fosse possível contar colónias em todos os poços. Salienta-se ainda que o meio de cultura das placas foi renovado 72h após a irradiação das células.

Tabela 4: Número de células semeadas por poço, para cada linha celular, para cada uma das doses de raios-X utilizadas.

Dose (Gy)		Nº de células/poço						
		0	0,5	1	2	4	6	8
Linha celular	PANC-1	100	100	100	100	400	400	400
Linha celular	Hs 766T	500	500	500	500	500	500	500

Quanto ao tratamento com olaparib em monoterapia, após as células terem sido semeadas, administraram-se as respetivas concentrações de olaparib referidas na **Secção 3.3.2**. Para a linha celular PANC-1 semearam-se 100 células por poço enquanto que para a linha celular Hs 766T se semearam 500 células por poço. Neste caso, utilizaram-se duas condições de controlo com células sem tratamento: uma apenas com meio de cultura e outra com a adição do veículo (DMSO), de forma a aferir se os efeitos observados são efetivamente do olaparib e se o solvente não tem efeito citotóxico. Além disso, foram testadas duas abordagens: a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação e a remoção do meio com olaparib 72h após a sua administração, seguida da adição de meio fresco sem olaparib. Estas abordagens serviram para avaliar a diferença do efeito do olaparib na sobrevivência celular a curto (72h de incubação) ou longo prazo (incubação durante todo o ensaio clonogénico).

Para o tratamento combinado de radioterapia com olaparib, seguiu-se o procedimento descrito na **Secção 3.3.3**, pelo que após a irradiação se administrou a concentração de 1 μ M de olaparib em todas as condições, exceto nas condições de controlo sem tratamento. O número de células semeadas por poço foi o mesmo que o utilizado no tratamento com radioterapia em monoterapia (**Tabela 4**). Neste caso, foram utilizadas três condições de

controle com células não expostas à radiação: uma apenas com meio de cultura, outra com veículo (DMSO) e uma terceira com 1 μ M de olaparib. Além disso, foram também testadas as duas abordagens de permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação ou a sua remoção 72h após a administração, através da substituição do meio de cultura, de forma a averiguar se existiam diferenças significativas entre as duas estratégias.

Depois das células terem sido semeadas nas placas, foram incubadas por um período de tempo adequado para a formação de colônias, tendo em conta o seu tempo de duplicação. Desta maneira, o tempo de incubação utilizado para a linha celular PANC-1 foi de 12-13 dias e para a linha celular Hs 766T foi de 15-16 dias.

Após a incubação procedeu-se à coloração das colônias. Para tal, o meio de cultura foi descartado e as células foram fixadas com 2 mL de metanol, durante 20 minutos. Terminado esse período, descartou-se o metanol e adicionaram-se 2 mL de uma solução de 0,5% de violeta de cristal (Sigma, C3886), sendo este um corante que se liga ao DNA. Após 20 minutos de incubação, removeu-se o corante e lavaram-se as placas com água. As placas foram deixadas a secar à temperatura ambiente e depois contaram-se as colônias existentes nos poços. Todas as células que compõem uma colônia são a descendência de uma única célula inicialmente semeada, que sobreviveu ao tratamento, no entanto, o número de células semeadas não tratadas nunca é igual ao número de colônias formadas, devido a fatores como o stresse induzido nas células pela ida ao hospital, a mudança de meio, não aderência de todas as células semeadas, erros e incertezas na contagem da suspensão celular e o descolamento [39].

Após a contagem das colônias, foi possível definir-se a eficiência de placa (PE, do inglês *plate efficiency*), que corresponde à fração de células semeadas que se transformaram em colônias, e o fator de sobrevivência (FS), que compara a capacidade das células de controle e das células tratadas formarem colônias, de acordo com a **Equação 5** e a **Equação 6**, respetivamente. A experiência foi realizada pelo menos 5 vezes ($n \geq 5$) em duplicado.

$$PE = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colónias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células semeadas}}$$

Equação 5: Fórmula utilizada para calcular a eficiência de placa (PE).

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

Equação 6: Fórmula utilizada para calcular o fator de sobrevivência (FS).

3.4.1 Análise estatística

O ensaio clonogénico permitiu a obtenção das curvas de sobrevivência celular para os diferentes tipos de tratamentos referidos em 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3, para ambas as linhas celulares utilizadas. Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa *GraphPad Prism 9.5.0*, (Macintosh Version by Software Mackiev © 1994-2022 GraphPad Software, LLC).

Numa primeira fase, traçou-se a curva de sobrevivência com os resultados do tratamento com radiação ionizante em regime de monoterapia, relacionando a sobrevivência celular com as doses administradas. Com esse objetivo, os valores dos fatores de sobrevivência em função da dose foram ajustados a uma regressão não linear. Para isso, foram testados dois modelos de ajuste utilizados em radiobiologia: o linear (**Equação 7**) e o linear quadrático (**Equação 8**). O modelo linear pressupõe que a sobrevivência tem um comportamento linear com a dose de radiação. No entanto, o modelo linear quadrático é geralmente mais utilizado, tendo sido validado por dados experimentais e clínicos [39]. Além de incorporar o termo linear, relacionado ao parâmetro α , que se deve a lesões complexas e letais do DNA, agrega um termo quadrático, relacionado com o parâmetro β , associado a múltiplas lesões sub-letais [96,97]. O parâmetro α domina a região inicial da curva, das doses baixas, enquanto que o β traduz a região da curva nas doses mais altas, uma vez que o termo quadrático (βD^2) cresce mais rapidamente com a dose do que o linear (αD) [39]. O modelo linear quadrático permite ainda determinar a razão α/β que possibilita caracterizar a inclinação do componente quadrático da curva de sobrevivência celular. O modelo utilizado para traçar a curva foi então o linear quadrático uma vez que foi o que melhor se ajustou ao conjunto de resultados.

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

Equação 7: Expressão do modelo linear em radiobiologia, em que FS representa a fração de células sobreviventes, α o parâmetro linear (Gy^{-1}) e D a dose de radiação (Gy).

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

Equação 8: Expressão do modelo linear quadrático em radiobiologia, em que FS representa a fração de células sobreviventes, α o parâmetro linear (Gy^{-1}), β o parâmetro quadrático (Gy^{-2}) e D a dose de radiação (Gy).

Seguidamente, traçaram-se as curvas de sobrevivência para o tratamento com olaparib em regime de monoterapia, relacionando a sobrevivência celular com as concentrações de inibidor administradas, para as duas abordagens testadas, descritas em 3.4. Neste caso, os valores dos fatores de sobrevivência foram normalizados aos do controlo com veículo, uma vez que o olaparib estava dissolvido em DMSO. Desta maneira, o controlo com meio de cultura serviu apenas para aferir se o DMSO exercia algum efeito citotóxico nas células. Para a obtenção das curvas, os dados foram ajustados a uma regressão não linear com declive variável, com os valores dos fatores de sobrevivência em função da concentração do inibidor. Além disso, comparam-se os valores dos fatores de sobrevivência do tratamento com 1 μM de olaparib, quando este permaneceu em contacto com as células durante 72h ou durante todo o tempo de incubação, ao valor de fator de sobrevivência igual a 1, de forma a aferir se esta concentração de inibidor é de facto não citotóxica por si só. Para isso, realizou-se o teste estatístico de *Shapiro-Wilk* de forma a verificar a normalidade da distribuição dos dados. Uma vez que os dados de ambas as linhas celulares passaram no teste de normalidade ($p > 0,05$), realizou-se o teste paramétrico *one sample t-test* para determinar se a média da amostra era significativamente diferente do valor 1 que corresponde a 100% de sobrevivência.

Por último, foram traçadas as curvas de sobrevivência para o tratamento combinado de radioterapia com olaparib, para as duas abordagens descritas em 3.4. Para a obtenção destas curvas, os valores dos fatores de sobrevivência em função da dose de radiação foram ajustados ao modelo linear quadrático, uma vez que demonstrou ser o modelo que melhor se ajustou aos resultados. Os valores dos fatores de sobrevivência foram normalizados aos do controlo com veículo, tendo servido o controlo com 1 μM de olaparib apenas para verificar o efeito deste em células sem tratamento de radioterapia.

Para quantificar os efeitos da radiação ionizante foram determinados parâmetros como: o D_{50} , ou seja, a dose de radiação que diminui a sobrevivência celular para 50%, o D_{10} , que representa a dose de radiação que diminui a sobrevivência celular para 10% (ambos através da **Equação 9** e a respetiva incerteza de acordo com a **Equação 10**), o FS_{2Gy} , que corresponde à fração de células sobrevivente à dose de radiação de 2 Gy, a razão α/β e a dose média de inativação (MID, do inglês *mean inactivation dose*), que é calculado através da estimativa da área sob a curva de sobrevivência e representa a dose média necessária para causar a morte à população de células expostas [97]. De forma a avaliar o efeito do olaparib foi calculado o valor da concentração inibitória média, IC_{50} (do inglês, *half-maximal inhibitory concentration*), que representa a concentração de inibidor que diminui a sobrevivência celular para 50% [98].

$$D_{FS} = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 - 4\beta \ln(FS)}}{2\beta}$$

Equação 9: Fórmula utilizada para calcular o D_{50} (FS=0,50) e o D_{10} (FS=0,10).

$$\begin{aligned} \sigma_{D_{FS}} &= \sqrt{\left(\frac{\partial D_{FS}}{\partial \alpha} \sigma_{\alpha}\right)^2 + \left(\frac{\partial D_{FS}}{\partial \beta} \sigma_{\beta}\right)^2 + 2 \frac{\partial D_{FS}}{\partial \alpha} \frac{\partial D_{FS}}{\partial \beta} \sigma_{\alpha} \sigma_{\beta} \text{cov}(\sigma_{\alpha}, \sigma_{\beta})} \\ &= \sqrt{\left(\frac{1}{2\beta} \left(\frac{\alpha}{\sqrt{\alpha^2 - 4\beta \ln(FS)}} - 1\right) \sigma_{\alpha}\right)^2 + \left(\frac{1}{2\beta^2} \left(\alpha + \frac{2\beta \ln(FS) - \alpha^2}{\sqrt{\alpha^2 - 4\beta \ln(FS)}}\right) \sigma_{\beta}\right)^2 + 2 \frac{\partial D_{FS}}{\partial \alpha} \frac{\partial D_{FS}}{\partial \beta} \sigma_{\alpha} \sigma_{\beta} \text{cov}(\sigma_{\alpha}, \sigma_{\beta})} \end{aligned}$$

Equação 10: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao D_{50} (FS=0,50) e ao D_{10} (FS=0,10).

Para avaliar a eficácia da combinação determinou-se o valor SER (do inglês, *sensitization enhancement ratio*), que permitiu aferir se através da combinação da radioterapia com o olaparib era possível alcançar o mesmo efeito biológico com uma menor dose de radiação quando comparado à radioterapia isoladamente [99]. Um valor SER maior que 1 indica que a combinação resulta em sensibilização, o que sugere uma melhor eficácia do tratamento combinado. O SER pode ser calculado através dos valores obtidos de D_{50} , D_{10} da radioterapia em monoterapia e dos tratamentos combinados segundo a **Equação 11** e a sua respetiva incerteza através da **Equação 12**. Pode também ser obtido através dos valores obtidos de FS_{2Gy} segundo a **Equação 13** e a sua respetiva incerteza através da **Equação 14**. Ou ainda

através do conceito MID, que é representativo de toda a população celular, minimiza as flutuações nas curvas de sobrevivência e tem em conta toda a curva de sobrevivência, segundo a **Equação 15** e a sua respetiva incerteza segundo a **Equação 16** [97].

$$SER_{D_{FS}} = \frac{D_{FS}(\text{radioterapia})}{D_{FS}(\text{combinação})}$$

Equação 11: Fórmula utilizada para o cálculo do SER para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib, através dos valores de D_{50} (FS=0,50) e D_{10} (FS=0,10).

$$\begin{aligned} \sigma_{SER_{D_{FS}}} &= \sqrt{\left(\frac{\partial SER_{D_{FS}}}{\partial D_{FS}(\text{radioterapia})} \sigma_{D_{FS}(\text{radioterapia})}\right)^2 + \left(\frac{\partial SER_{D_{FS}}}{\partial D_{FS}(\text{combinação})} \sigma_{D_{FS}(\text{combinação})}\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{\sigma_{D_{FS}(\text{radioterapia})}}{D_{FS}(\text{combinação})}\right)^2 + \left(\frac{D_{FS}(\text{radioterapia})}{D_{FS}(\text{combinação})^2} \sigma_{D_{FS}(\text{combinação})}\right)^2} \end{aligned}$$

Equação 12: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao $SER_{D_{50}}$ (FS=0,50) e ao $SER_{D_{10}}$ (FS=0,10) para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib.

$$SER_{FS_{2Gy}} = \frac{FS_{2Gy}(\text{radioterapia})}{FS_{2Gy}(\text{combinação})}$$

Equação 13: Fórmula utilizada para o cálculo do SER para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib, através dos valores de FS_{2Gy} .

$$\begin{aligned} \sigma_{SER_{FS_{2Gy}}} &= \sqrt{\left(\frac{\partial SER_{FS_{2Gy}}}{\partial FS_{2Gy}(\text{radioterapia})} \sigma_{FS_{2Gy}(\text{radioterapia})}\right)^2 + \left(\frac{\partial SER_{FS_{2Gy}}}{\partial FS_{2Gy}(\text{combinação})} \sigma_{FS_{2Gy}(\text{combinação})}\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{\sigma_{FS_{2Gy}(\text{radioterapia})}}{FS_{2Gy}(\text{combinação})}\right)^2 + \left(\frac{FS_{2Gy}(\text{radioterapia})}{FS_{2Gy}(\text{combinação})^2} \sigma_{FS_{2Gy}(\text{combinação})}\right)^2} \end{aligned}$$

Equação 14: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao $SER_{FS_{2Gy}}$ para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib.

$$\text{SER}_{\text{MID}} = \frac{\text{MID (radioterapia)}}{\text{MID (combinação)}}$$

Equação 15: Fórmula utilizada para o cálculo do SER para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib, através do conceito MID.

$$\begin{aligned} \sigma_{\text{SER}_{\text{MID}}} &= \sqrt{\left(\frac{\partial \text{SER}_{\text{MID}}}{\partial \text{MID (radioterapia)}} \sigma_{\text{MID (radioterapia)}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \text{SER}_{\text{MID}}}{\partial \text{MID (combinação)}} \sigma_{\text{MID (combinação)}}\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{\sigma_{\text{MID (radioterapia)}}}{\text{MID (combinação)}}\right)^2 + \left(\frac{\text{MID (radioterapia)}}{\text{MID (combinação)}^2} \sigma_{\text{MID (combinação)}}\right)^2} \end{aligned}$$

Equação 16: Fórmula utilizada para o cálculo da incerteza associada ao SER_{MID} para a combinação da radioterapia com 1 μM de olaparib.

3.5 Avaliação da genotoxicidade

O ensaio de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese é um teste amplamente utilizado para avaliar a genotoxicidade do tratamento, ou seja, a capacidade de causar lesões no DNA. Este ensaio permite avaliar lesões cromossómicas, como quebra ou perda cromossómica, reparação incorreta do DNA, não disjunção, necrose, apoptose e citostase [100].

Os micronúcleos são formados durante a anáfase a partir de fragmentos cromossómicos ou cromossomas inteiros que são deixados para trás quando o núcleo se divide, sendo um biomarcador de rutura cromossómica ou de perda de cromossomas inteiros (**Figura 13**) [101]. A presença de micronúcleos apenas pode ser quantificada em células binucleadas (BN), ou seja, em células que sofreram divisão do núcleo, mas não sofreram divisão do citoplasma [100]. Assim, neste ensaio, utiliza-se a citocalasina B que induz o bloqueio da citocinese – processo de divisão do citoplasma – para se obterem células binucleadas. A citocalasina B é um inibidor da polimerização da actina, que é uma proteína responsável pela formação do anel de microfilamentos necessário para a divisão do citoplasma [100].

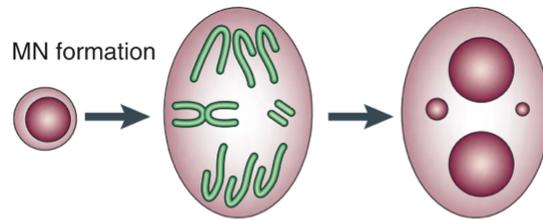


Figura 13: Representação da formação de micronúcleos numa célula binucleada após o bloqueio da citocinese. Adaptada de: [100].

Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm² (SPL Life Sciences 70025) e as condições realizadas foram: controlo, irradiação com 2 Gy, 1 µM de olaparib e combinação de irradiação com 2 Gy com 1 µM de olaparib.

Após 48h da realização do tratamento, adicionou-se ao meio de cultura 1 µg/mL de citocalasina B (Sigma C6762) e incubaram-se novamente as células por mais 24h. Passado esse tempo, procedeu-se ao destacamento celular e à centrifugação de cada suspensão celular a 1300 xG durante 5 minutos. Depois, descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 2 mL de metanol:ácido acético (3:1) e centrifugaram-se as suspensões a 100 xG durante 5 minutos, tendo-se repetido este passo duas vezes. De seguida, descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 2 mL de metanol:ácido acético (3:1), homogeneizou-se e colocaram-se 3 gotas de cada condição ao longo de uma lâmina de vidro (Normax 5470317C). As lâminas foram deixadas a secar e depois coradas com uma solução de Giemsa (Merck, Alemanha) a 5% em PBS (pH 6,8), por 10 minutos. Passado esse tempo, foram lavadas com água e depois de secas foram digitalizadas num *scanner* apropriado (VENTANA DP 200). A experiência foi realizada 3 vezes (n=3).

3.5.1 Análise estatística

As imagens foram analisadas recorrendo ao *software* QuPath-0.5.1-arm64 onde se analisaram aproximadamente 200 células binucleadas por cada condição. A avaliação da genotoxicidade dos tratamentos foi realizada através da quantificação do número de micronúcleos em células binucleadas. Após a contagem das células binucleadas com um, dois e três ou mais micronúcleos para as diferentes condições, foram realizados dois gráficos. Um com a quantificação geral da percentagem de células com micronúcleos por células

binucleadas e outro com a quantificação da percentagem de células binucleadas com um, dois e três ou mais micronúcleos por células binucleadas, no programa *GraphPad Prism* 9.5.0, (*Macintosh Version by Software MacKiev* © 1994-2022 *GraphPad Software, LLC*). Para cada linha celular, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas de forma a verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições.

3.6 Imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica que permite a deteção e a localização de uma grande variedade de moléculas através do uso de anticorpos específicos marcados com fluoróforos [102]. Desta maneira, este ensaio foi utilizado para detetar e quantificar *foci* dos marcadores de lesões do DNA, como a γ -H2AX e o 53BP1.

A fosforilação do resíduo serina-139 da histona H2AX, formando γ -H2AX, é uma resposta celular precoce à indução de DSBs no DNA [103]. Esta resposta ocorre poucos minutos após a lesão, tornando-a um marcador útil para detetar DSBs no DNA [104]. Além de sinalizar a lesão, o γ -H2AX também desempenha um papel ativo no recrutamento de proteínas envolvidas na reparação do DNA [105]. Assim, as DSBs podem ser visualizadas como *foci* de γ -H2AX através da microscopia de imunofluorescência utilizando um anticorpo específico, uma vez que cada DSB corresponde a um *foci* de γ -H2AX [106].

A proteína 1 de ligação à P53 (53BP1, do inglês *P53-binding protein 1*) é rapidamente recrutada para o local das DSBs, acumulando-se e promovendo a sua reparação por junção de extremidades não-homólogas [107]. Desta maneira, o 53BP1 pode ser utilizado como marcador da reparação de DSBs.

Considerando as suas funções, a análise da co-localização de *foci* de γ -H2AX e 53BP1 por microscopia de imunofluorescência é um método adequado para detetar a formação e reparação de DSBs [107].

Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em poços contendo uma lamela numa placa de 24 poços, numa concentração de 30 000 células por poço e as condições realizadas foram: controlo, irradiação com 2 Gy, 1 μ M de olaparib e combinação de irradiação com 2 Gy com 1 μ M de olaparib.

O ensaio foi realizado às 2h e às 24h após as células terem sido submetidas aos tratamentos. No caso da realização do ensaio após 2h de incubação foi necessário centrifugar as células a 100 xG durante 10 minutos, antes da remoção do meio de cultura e depois da lavagem com PBS, uma vez que estas ainda não tinham aderido à placa. De seguida, tanto no caso das 2h como das 24h, procedeu-se à fixação das células com 200 μ L de paraformaldeído a 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 200 μ L de Triton X-100 a 0,3% em PBS durante 15 minutos. A permeabilização da membrana celular e nuclear das células permite o acesso dos anticorpos ao núcleo, onde se encontra o DNA nuclear. Depois disso, as células foram bloqueadas com 1% de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) em PBS durante 1h à temperatura ambiente. Este bloqueio com BSA é um passo crítico para reduzir a ligação não específica de anticorpos, melhorando a especificidade e a sensibilidade das deteções. Passado esse tempo, a BSA foi descartada, adicionaram-se 200 μ L dos anticorpos PE anti-H2AX Phospho (Ser139) (Biolegend 613412) e 53BP1 (E-10) FITC (Santa Cruz Biotechnology sc-515841) numa proporção de 1:400 em 1% de BSA em PBS e as células foram incubadas durante a noite a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 200 μ L de DAPI (1 μ g/mL) durante 10 minutos. Depois as células foram novamente lavadas com PBS e montaram-se as lamelas em lâminas de vidro (Normax 5470317C) com meio de montagem (Dako C0563). Finalmente, após o endurecimento do meio de montagem os *foci* de γ -H2AX e 53BP1 foram analisados em núcleos celulares marcados com DAPI num microscópio invertido de fluorescência (microscópio Zeiss Axio Observer.Z1 configurado com uma fonte de luz de fluorescência HXP 120 V e uma câmara digital CCD (AxioCam HRm)), equipado com uma objetiva EC Plan-Neofluar Plan-Apochromat 20x/0.8 e o software Zen Black 2012, todos da Carl Zeiss, Alemanha. A experiência foi realizada 3 vezes (n=3) em duplicado.

3.6.1 Análise estatística

Para analisar as imagens obtidas foi utilizado o programa *CellProfiler* que permitiu obter o número de *foci* presentes em cada núcleo e a média da intensidade de fluorescência (MIF) por *foci*, para cada condição. Deste maneira foi possível obter três gráficos no programa *GraphPad Prism 9.5.0*, (Macintosh Version by Software Mackiev © 1994-2022 GraphPad Software, LLC): a quantificação do número médio de *foci* de γ -H2AX ou 53BP1 por núcleo, a percentagem de

núcleos positivos para γ -H2AX ou para 53BP1, ou seja, núcleos com mais *foci* que um *threshold* definido com base na condição de controlo (média do número de *foci* mais duas vezes o desvio padrão) e a média da intensidade de fluorescência por *foci* de γ -H2AX ou 53BP1, para cada linha celular. Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições utilizou-se o teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.

4. Resultados¹

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

4.1 Tempo de duplicação

A curva de crescimento e a determinação do tempo de duplicação permitiram um melhor conhecimento das linhas celulares em estudo e a obtenção do tempo de incubação ideal das células para o ensaio clonogénico.

Na **Figura 14** encontram-se as curvas de crescimento de cada uma das linhas celulares, com o número de células vivas em função do tempo, e na **Tabela 5** estão apresentados os valores correspondentes ao tempo de duplicação e respetiva incerteza, coeficiente de determinação R^2 e tempo de incubação calculado para o ensaio clonogénico, correspondente a seis tempos de duplicação, para ambas as linhas celulares.

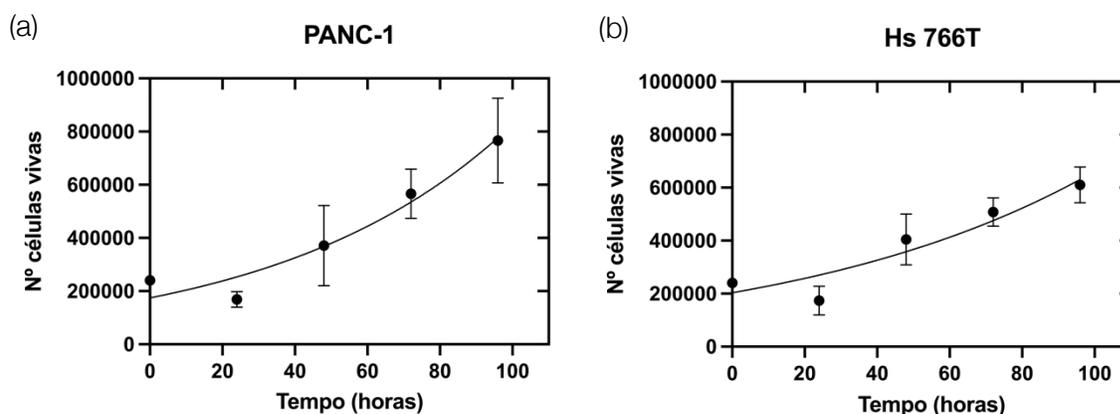


Figura 14: Curvas de crescimento da linha celular PANC-1 (a) e Hs 766T (b). Os resultados expressam o número de células vivas (média±desvio padrão) em função do tempo, em horas, de 3 experiências independentes em duplicado.

Estas curvas mostram que as duas linhas celulares apresentaram diferentes padrões de crescimento, sendo que a curva de crescimento da linha celular PANC-1 teve um aumento mais acentuado que a curva de crescimento da linha celular Hs 766T, o que sugere que a primeira prolifera mais rapidamente.

Tabela 5: Valores do tempo de duplicação (DT) e respectivas incertezas, em horas, coeficiente de determinação R² e tempo de incubação calculado para o ensaio clonogénico, em dias, para ambas as linhas celulares.

	DT±σ _{DT} (horas)	R ²	Tempo de incubação (dias)
PANC-1	44,56±6,79	0,82	11,14
Hs 766T	58,80±8,73	0,81	14,70

A linha celular PANC-1 apresentou um tempo de duplicação menor (44,56±6,79 horas) que a linha celular Hs 766T (58,80±8,73 horas), o que significa que a linha celular PANC-1 demora menos tempo a duplicar a sua população e, por isso, é mais rápida a proliferar.

Após a obtenção do tempo de duplicação de cada linha celular, foi possível calcular o tempo de incubação ideal para o ensaio clonogénico. Assim, o tempo necessário para a formação de colónias visíveis a olho nu é de, pelo menos, 12 dias para as células da linha celular PANC-1 e de, pelo menos, 15 dias para as células da linha celular Hs 766T, pelo que estes foram os tempos de incubação utilizados para a realização do ensaio clonogénico.

4.2 Avaliação da sobrevivência celular

Começou-se por avaliar a sobrevivência celular após o tratamento com radioterapia e/ou olaparib, num regime de monoterapia e depois num regime de combinação, através do ensaio clonogénico, para ambas as linhas celulares em estudo.

As curvas de sobrevivência para o tratamento com olaparib em monoterapia, que evidenciam o fator de sobrevivência em função da concentração de inibidor, para as duas abordagens testadas de permanência do olaparib apenas 72h ou o tempo todo de incubação encontram-se na **Figura 15**. As curvas de ambas as linhas celulares demonstram que ocorreu uma diminuição da fração de células sobreviventes com o aumento da concentração de olaparib, colocando em evidência o aumento da citotoxicidade do inibidor com o aumento da concentração. Além disso, observou-se uma maior diminuição da sobrevivência celular com a estratégia de permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação comparativamente à estratégia de permanência do inibidor apenas 72h na linha celular PANC-1, enquanto que tal só se verificou a partir da concentração de 5 µM de olaparib na linha celular Hs 766T.

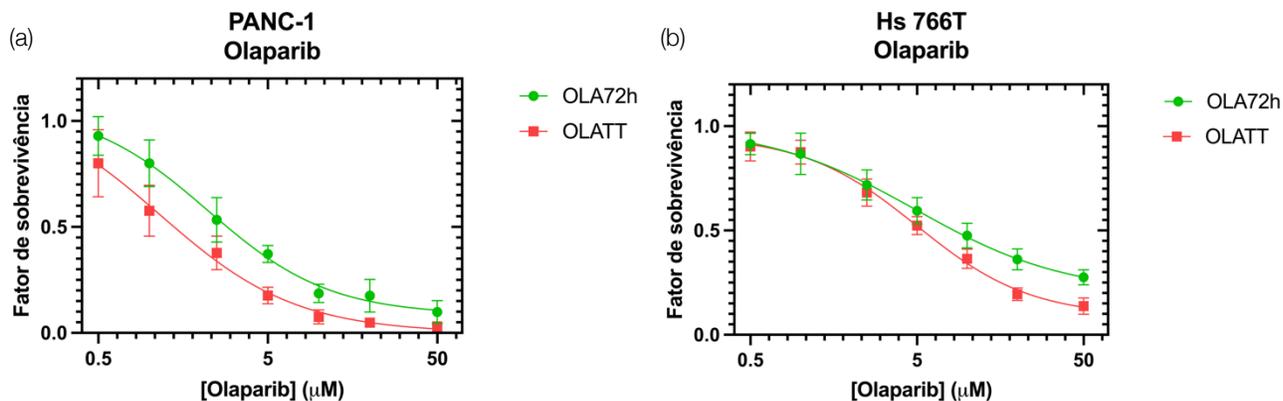


Figura 15: Curvas de sobrevivência obtidas para as linhas celulares PANC-1 (a) e Hs 766T (b) após o tratamento com olaparib em monoterapia para as duas abordagens testadas de permanência do olaparib apenas 72h (OLA72h) ou todo o tempo de incubação (OLATT). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média±desvio padrão) em função da concentração de olaparib, em μM , de pelo menos 5 experiências independentes em duplicado.

Na **Tabela 6** e na

Tabela 7 encontram-se os valores de IC_{50} e as respectivas incertezas obtidos após a administração isolada de olaparib com a sua remoção 72h depois ou a sua permanência durante todo o tempo de incubação, e o valor do coeficiente de determinação R^2 , para as linhas celulares PANC-1 e Hs 766T, respectivamente. Na **Figura 16** encontram-se os gráficos com os valores de IC_{50} obtidos para a linha celular PANC-1 e Hs 766T, respectivamente, onde foi utilizado o teste t de amostras independentes para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os regimes de incubação com o olaparib.

Os valores de IC_{50} obtidos para a linha celular PANC-1 mostram que a concentração de inibidor que diminuiu a sobrevivência celular para 50% foi significativamente mais baixa no tratamento com olaparib com a sua permanência durante todo o tempo de incubação, comparativamente ao tratamento com olaparib com a sua permanência apenas 72h. Já para a linha celular Hs 766T, os valores de IC_{50} obtidos para as duas estratégias estudadas foram bastante próximos, sem uma diferença estatisticamente significativa, tendo, no entanto, o tratamento com olaparib com a sua permanência apenas 72h apresentado um valor ligeiramente mais baixo que o tratamento com olaparib com a sua permanência durante todo o tempo de incubação. Comparando as duas linhas celulares, foram obtidos valores de IC_{50} mais baixos na linha celular PANC-1, o que indica que o olaparib exerce um maior efeito citotóxico nesta linha celular do que na linha celular Hs 766T.

Tabela 6: Valores de IC_{50} e respectivas incertezas obtidos após a administração isolada de olaparib com a sua remoção 72h depois (OLA72h) ou a sua permanência durante todo o tempo de incubação (OLATT) e valor do coeficiente de determinação R^2 para a linha celular PANC-1.

PANC-1	$IC_{50} \pm \sigma_{IC_{50}}$ (μM)	R^2
OLA72h	2,22 \pm 0,43	0,94
OLATT	1,16 \pm 0,59	0,92

Tabela 7: Valores de IC_{50} e respectivas incertezas obtidos após a administração isolada de olaparib com a sua remoção 72h depois (OLA72h) ou a sua permanência durante todo o tempo de incubação (OLATT) e valor do coeficiente de determinação R^2 para a linha celular Hs 766T.

Hs 766T	$IC_{50} \pm \sigma_{IC_{50}}$ (μM)	R^2
OLA72h	4,93 \pm 0,88	0,94
OLATT	4,99 \pm 0,48	0,97

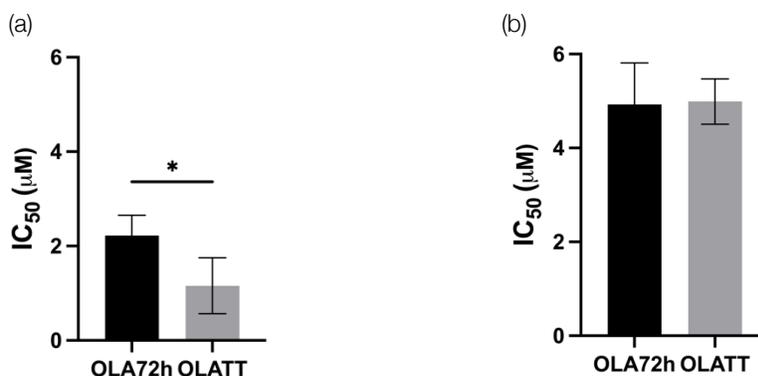


Figura 16: Gráficos representativos dos valores obtidos de $IC_{50} \pm$ desvio padrão, para a linha celular PANC-1 (a) e Hs 766T (b). A diferença estatisticamente significativa está representada por * que significa $p < 0,05$, determinada pelo teste t de amostras independentes.

Comparando os valores do fator de sobrevivência do tratamento com 1 μM de olaparib quando o inibidor permaneceu em contacto com as células durante 72h ou todo o tempo de incubação com o valor de fator de sobrevivência igual a 1, através do teste estatístico t de uma amostra (**Figura 17**), apenas se observou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,01$) da fração sobrevivente com a permanência do olaparib durante todo o tempo de

incubação para a linha celular PANC-1. Isto indica que, neste caso a concentração de 1 μM de olaparib exerce um ligeiro efeito citotóxico, diminuindo a sobrevivência celular para $0,72\pm 0,08$ quando permanece em contacto com as células durante todo o tempo de incubação. Verifica-se, no entanto, que nas restantes situações 1 μM de olaparib é uma concentração não citotóxica.

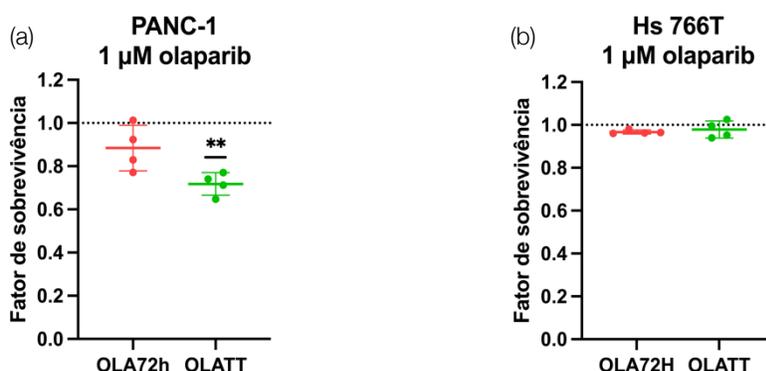


Figura 17: Comparação dos valores obtidos do fator de sobrevivência do tratamento com 1 μM de olaparib quando o inibidor permaneceu em contacto com as células durante 72h (OLA72h) ou todo o tempo de incubação (OLATT) com o valor de fator de sobrevivência igual a 1, para as linhas celulares PANC-1 (a) e Hs 766T (b). Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão do fator de sobrevivência, de 5 experiências independentes em duplicado. A diferença estatisticamente significativa está representada por ** que significa $p < 0,01$, determinada pelo teste t de uma amostra.

Na **Figura 18** estão representadas as curvas de sobrevivência, que evidenciam o fator de sobrevivência em função da dose de radiação-X, para os tratamentos de radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com 1 μM de olaparib com remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com 1 μM de olaparib com a permanência do inibidor durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT), para ambas as linhas celulares. Estas curvas foram obtidas segundo o modelo linear quadrático, uma vez que foi o modelo que melhor se ajustou ao conjunto de resultados. As curvas de sobrevivência de ambas as linhas celulares permitem inferir que ocorreu uma diminuição do fator de sobrevivência com o aumento de dose em todos os regimes de tratamento. Constatou-se um maior decréscimo da sobrevivência celular em ambas as estratégias de tratamento combinado relativamente à radioterapia em monoterapia, e o tratamento combinado com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação

apresentou valores de fator de sobrevivência ainda mais baixos que os obtidos para o tratamento combinado com remoção do olaparib 72h após a sua administração, principalmente na linha celular PANC-1, não tendo sido obtida uma diferença significativa entre as duas estratégias na linha celular Hs 766T. Além disso, a linha celular Hs 766T aparenta ser mais radorresistente que a linha celular PANC-1, uma vez que o decréscimo da curva de sobrevivência não é tão acentuado.

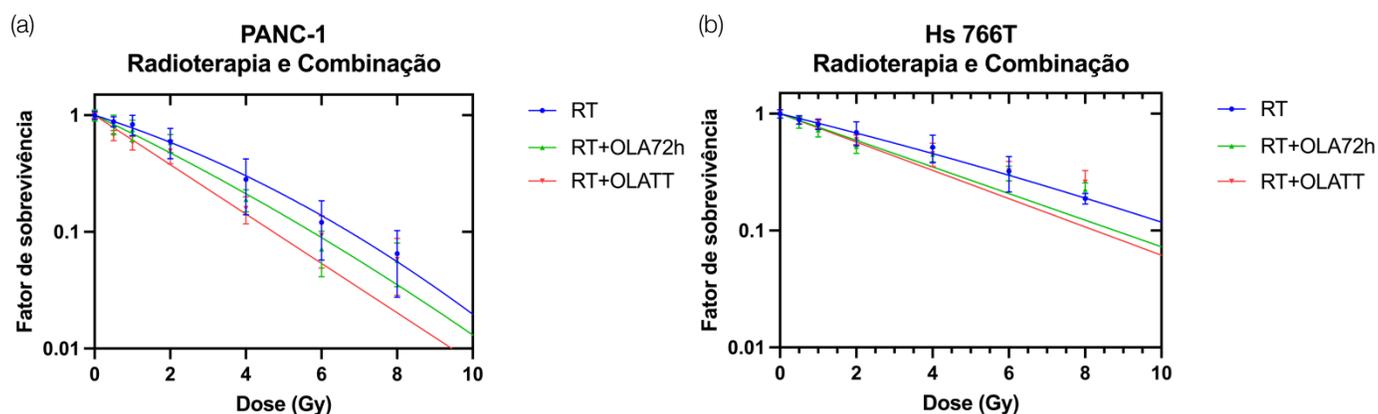


Figura 18: Curvas de sobrevivência obtidas para as linhas celulares PANC-1 (a) e Hs 766T (b) após o tratamento com radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT). Os resultados expressam o fator de sobrevivência (média±desvio padrão) em função da dose de radiação-X, em Gy, de pelo menos 5 experiências independentes em duplicado.

Na **Tabela 8** e na **Tabela 10** encontram-se os valores dos parâmetros α e β do modelo linear quadrático, da razão α/β , os parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} e as suas respectivas incertezas, bem como o valor do coeficiente de determinação R^2 obtidos para o tratamento de radioterapia em monoterapia, combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação, para as linhas celulares PANC-1 e Hs 766T, respectivamente. Na **Figura 19** e na **Figura 20** (a), (b), (c) e (d) encontram-se os gráficos com os valores dos parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} obtidos para a linha celular PANC-1 e Hs 766T, respectivamente, onde foi utilizado o teste estatístico ANOVA unifatorial com correção de *Tukey* para comparações múltiplas, de forma a comparar as médias destes

parâmetros obtidos para os três tipos de tratamento e verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas.

Verificou-se que, em ambas as linhas celulares, o valor de α aumentou do tratamento de radioterapia em monoterapia para o tratamento combinado de radioterapia com olaparib, tendo os valores mais altos sido obtidos com o tratamento combinado com permanência do inibidor durante todo o tempo de incubação. Um valor de α mais alto indica uma maior suscetibilidade das células a lesões letais, logo há uma maior radiosensibilização das células com o tratamento combinado, em especial com a estratégia da permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação. O valor de β diminuiu, em ambas as linhas celulares, entre o tratamento de radioterapia em monoterapia e a combinação, o que sugere uma diminuição da contribuição das lesões sub-letais associadas ao termo quadrático, tendo sido o valor mais baixo obtido para a estratégia de permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação no tratamento combinado. Quanto à razão α/β , observou-se um aumento da razão, em ambas as linhas celulares, entre o tratamento de radioterapia em monoterapia e o tratamento combinado, o que indica que o ombro das curvas foi ficando mais estreito, pondo em evidência a maior contribuição da componente linear. Além disso, constatou-se que os valores de D_{50} , de D_{10} e de FS_{2Gy} diminuíram do tratamento de radioterapia em monoterapia para os tratamentos combinados de radioterapia com olaparib, tendo os valores mais baixos sido obtidos com o tratamento combinado com permanência do inibidor durante todo o tempo de incubação. Uma diminuição do D_{50} e do D_{10} indica que uma dose radiação mais baixa no tratamento combinado é capaz de alcançar o mesmo efeito que uma dose de radiação mais alta no tratamento de radioterapia em monoterapia, pelo que denota que ocorreu radiosensibilização das células no tratamento combinado. Uma diminuição do FS_{2Gy} sugere que uma menor proporção de células sobrevive após a exposição a 2 Gy de radiação, pelo que as células se tornaram mais sensíveis aos efeitos da radiação no tratamento combinado. Quanto ao MID, verificou-se um decréscimo deste valor entre o tratamento de radioterapia em monoterapia e os tratamentos combinados, tendo o valor mais baixo sido obtido na estratégia de permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação para a linha celular PANC-1 enquanto que na linha celular Hs 766T não se verificaram diferenças entre as duas abordagens. Uma diminuição do MID significa que a área sob a curva diminuiu, sugerindo também uma radiosensibilização das células com os tratamentos combinados relativamente ao tratamento de radioterapia em monoterapia.

Comparando as duas linhas celulares, a linha celular PANC-1 apresentou valores de α e de β mais altos, em todos os tipos de tratamento, que a linha celular Hs 766T, o que sugere que a primeira responde melhor à radiação/tratamento combinado. Relativamente à razão α/β , a linha celular Hs 766T apresenta maiores valores, em todos os tipos de tratamento, que a linha celular PANC-1. Os valores obtidos para os parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} foram menores para a linha celular PANC-1 sugerindo que esta linha celular é mais radiosensível que a linha celular Hs 766T.

Na **Tabela 9** e na **Tabela 11** estão apresentados os valores dos parâmetros $SER_{D_{50}}$, $SER_{D_{10}}$, SER_{MID} e $SER_{FS_{2Gy}}$ e as respectivas incertezas, associados aos tratamentos combinados de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração e de radioterapia com olaparib com a permanência do inibidor durante todo o tempo de incubação, para as linhas celulares PANC-1 e Hs 766T, respetivamente. Na **Figura 19** e na **Figura 20** (e), (f), (g) e (h) encontram-se os gráficos com os valores dos parâmetros $SER_{D_{50}}$, $SER_{D_{10}}$, SER_{MID} e $SER_{FS_{2Gy}}$ obtidos para a linha celular PANC-1 e Hs 766T, respetivamente, onde foi utilizado o teste t de amostras independentes para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as médias destes parâmetros para as duas abordagens de tratamento combinado.

Todos os valores de SER obtidos para as duas linhas celulares foram maiores que 1, o que indica que o olaparib foi capaz de potenciar o efeito da radioterapia, permitindo uma redução de dose de radiação-X para a obtenção do mesmo efeito. Constatou-se ainda que o tratamento combinado de radioterapia e de olaparib com a permanência do inibidor durante todo o tempo de incubação apresentou, predominantemente, valores de SER mais altos que os obtidos com o tratamento combinado de radioterapia e olaparib com a remoção do inibidor 72h após a sua administração, sugerindo uma melhor eficácia desta abordagem.

Tabela 8: Valores dos parâmetros α e β do modelo linear quadrático, da razão α/β , dos parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} e as suas respectivas incertezas, bem como o valor do coeficiente de determinação R^2 , obtidos para o tratamento de radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular PANC-1.

PANC-1	$\alpha \pm \sigma_\alpha$ (Gy^{-1})	$\beta \pm \sigma_\beta$ (Gy^{-2})	$\frac{\alpha}{\beta} \pm \sigma_{\frac{\alpha}{\beta}}$ (Gy)	$D_{50} \pm \sigma_{D_{50}}$ (Gy)	$D_{10} \pm \sigma_{D_{10}}$ (Gy)	MID $\pm \sigma_{MID}$ (Gy)	$FS_{2Gy} \pm \sigma_{FS_{2Gy}}$	R^2
RT	0,24 \pm 0,03	0,016 \pm 0,005	15,05 \pm 5,97	2,52 \pm 0,14	6,74 \pm 0,19	3,08 \pm 0,31	0,59 \pm 0,02	0,99
RT+OLA72h	0,36 \pm 0,07	0,008 \pm 0,013	45,48 \pm 83,35	1,87 \pm 0,22	5,75 \pm 0,33	2,69 \pm 0,17	0,48 \pm 0,04	0,98
RT+OLATT	0,49 \pm 0,11	4,54 $\times 10^{-13}$ \pm 0,03	1,07 $\times 10^{12}$ \pm 6,45 $\times 10^{22}$	1,42 \pm 0,33	4,73 \pm 1,09	2,33 \pm 0,16	0,38 \pm 0,05	0,98

Tabela 9: Valores dos parâmetros $SER_{D_{50}}$, $SER_{D_{10}}$, SER_{MID} e $SER_{FS_{2Gy}}$ com as suas respectivas incertezas, associados aos tratamentos combinados de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular PANC-1.

PANC-1	$SER_{D_{50}} \pm \sigma_{SER_{D_{50}}}$	$SER_{D_{10}} \pm \sigma_{SER_{D_{10}}}$	$SER_{MID} \pm \sigma_{SER_{MID}}$	$SER_{FS_{2Gy}} \pm \sigma_{SER_{FS_{2Gy}}}$
RT+OLA72h	1,34 \pm 0,18	1,17 \pm 0,07	1,14 \pm 0,14	1,23 \pm 0,12
RT+OLATT	1,77 \pm 0,42	1,43 \pm 0,33	1,32 \pm 0,16	1,55 \pm 0,23

Tabela 10: Valores dos parâmetros α e β do modelo linear quadrático, da razão α/β e dos parâmetros D_{50} , D_{10} , MID e FS_{2Gy} e as suas respectivas incertezas, bem como o valor do coeficiente de determinação R^2 , obtidos para o tratamento de radioterapia em monoterapia (RT), combinação de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e combinação de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular Hs 766T.

Hs 766T	$\alpha \pm \sigma_\alpha$ (Gy^{-1})	$\beta \pm \sigma_\beta$ (Gy^{-2})	$\frac{\alpha}{\beta} \pm \sigma_{\frac{\alpha}{\beta}}$ (Gy)	$D_{50} \pm \sigma_{D_{50}}$ (Gy)	$D_{10} \pm \sigma_{D_{10}}$ (Gy)	MID $\pm \sigma_{MID}$ (Gy)	$FS_{2Gy} \pm \sigma_{FS_{2Gy}}$	R^2
RT	0,19 \pm 0,02	0,003 \pm 0,003	63,42 \pm 61,91	3,56 \pm 0,19	10,68 \pm 0,37	4,20 \pm 0,31	0,68 \pm 0,02	0,99
RT+OLA72h	0,26 \pm 0,11	3,71 $\times 10^{-12}$ \pm 0,02	7,07 $\times 10^{10}$ \pm 3,35 $\times 10^{20}$	2,64 \pm 1,09	8,78 \pm 3,61	3,75 \pm 0,15	0,59 \pm 0,09	0,97
RT+OLATT	0,28 \pm 0,09	2,00 $\times 10^{-10}$ \pm 0,02	1,40 $\times 10^9$ \pm 1,32 $\times 10^{17}$	2,49 \pm 0,78	8,26 \pm 2,61	4,03 \pm 0,20	0,57 \pm 0,07	0,91

Tabela 11: Valores dos parâmetros $SER_{D_{50}}$, $SER_{D_{10}}$, SER_{MID} e $SER_{FS_{2Gy}}$ com as suas respetivas incertezas, associados aos tratamentos combinados de radioterapia com olaparib com a remoção do olaparib 72h após a sua administração (RT+OLA72h) e de radioterapia com olaparib com a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação (RT+OLATT) para a linha celular Hs 766T.

Hs 766T	$SER_{D_{50}} \pm \sigma_{SER_{D_{50}}}$	$SER_{D_{10}} \pm \sigma_{SER_{D_{10}}}$	$SER_{MID} \pm \sigma_{SER_{MID}}$	$SER_{FS_{2Gy}} \pm \sigma_{SER_{FS_{2Gy}}}$
RT+OLA72h	1,35±0,56	1,22±0,50	1,12±0,09	1,15±0,18
RT+OLATT	1,43±0,46	1,29±0,41	1,04±0,09	1,19±0,15

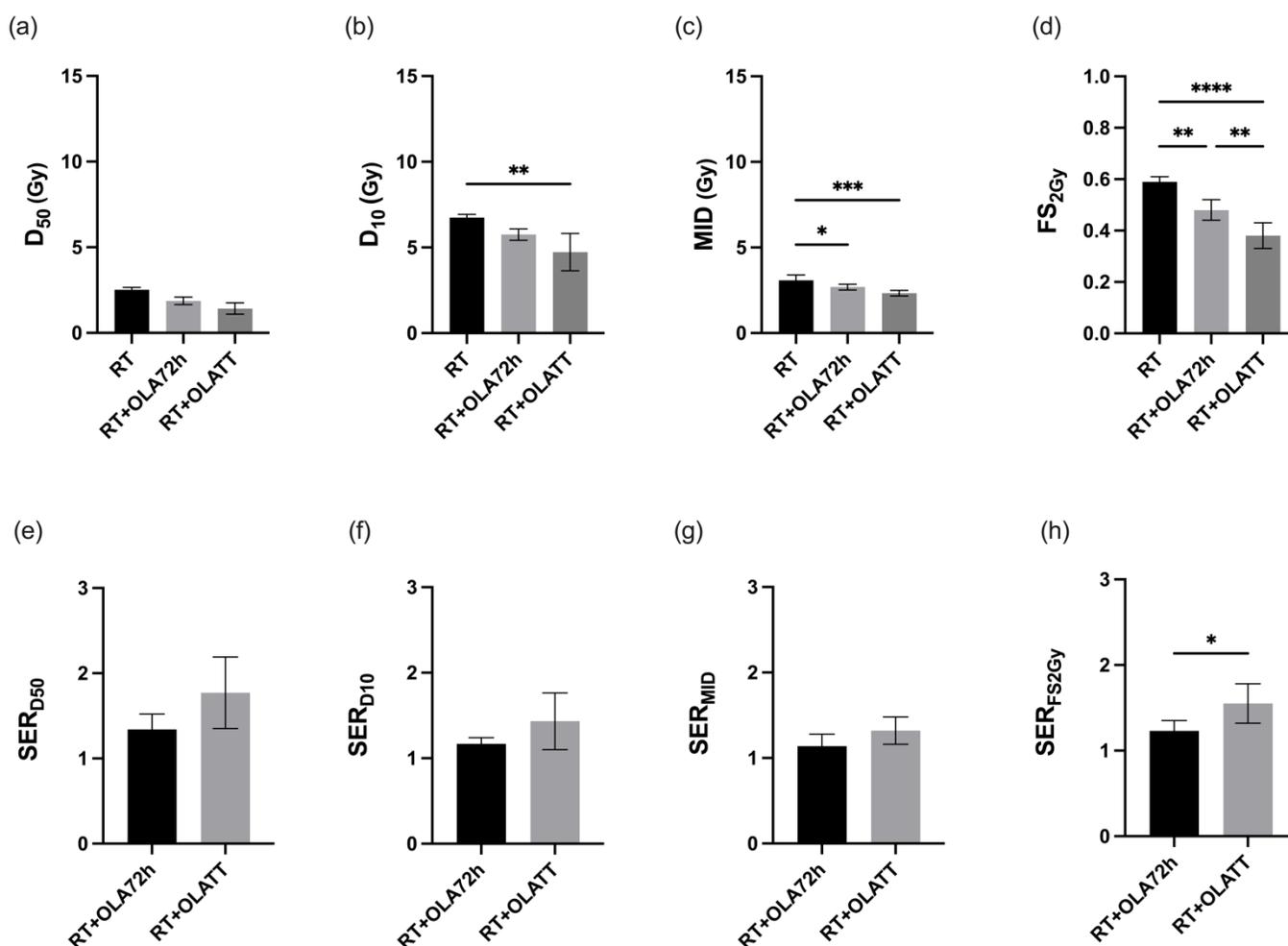


Figura 19: Gráficos representativos dos valores obtidos dos parâmetros D_{50} (a), D_{10} (b), MID (c), FS_{2Gy} (d), $SER_{D_{50}}$ (e), $SER_{D_{10}}$ (f), SER_{MID} (g) e $SER_{FS_{2Gy}}$ (h) com os desvios padrão, para a linha celular PANC-1. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e **** se $p < 0,0001$, determinadas pelo teste estatístico ANOVA unifatorial com correção de Tukey para comparações múltiplas.

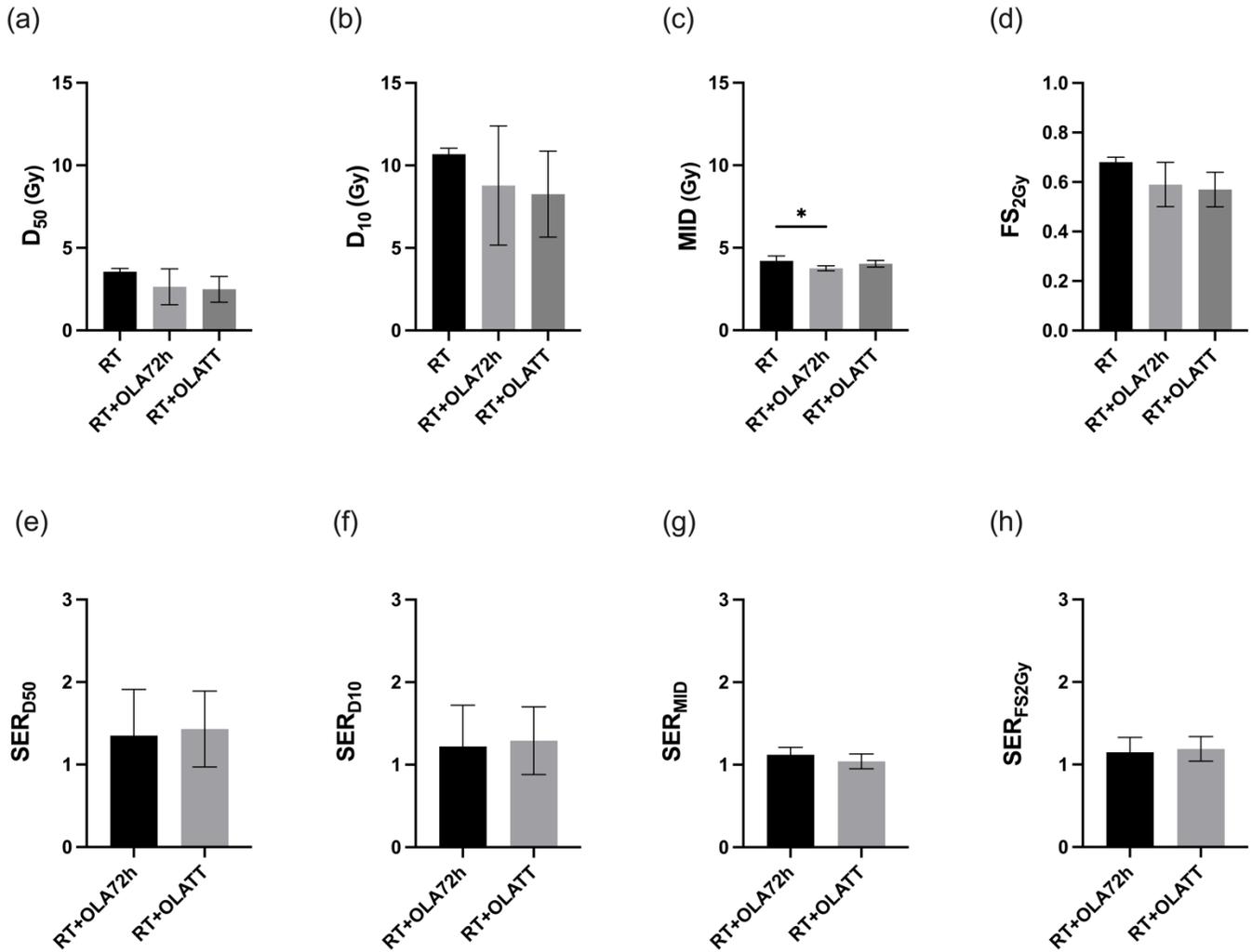


Figura 20: Gráficos representativos dos valores obtidos dos parâmetros D_{50} (a), D_{10} (b), MID (c), FS_{2Gy} (d), SER_{D50} (e), SER_{D10} (f), SER_{MID} (g) e SER_{FS2Gy} (h) com os desvios padrão, para a linha celular Hs 766T. A diferença estatisticamente significativa está representada por * que significa $p < 0,05$, determinada pelo teste estatístico ANOVA unifatorial com correção de *Tukey* para comparações múltiplas.

4.3 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar a genotoxicidade com os tratamentos de 2 Gy de radioterapia e 1 μ M de olaparib em monoterapia e em combinação foi realizado o ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese. A análise dos micronúcleos foi realizada através da sua quantificação em células binucleadas (BN), tendo sido ainda dividida por número de micronúcleos.

Na **Figura 21** e na **Figura 22** (a) encontra-se uma imagem representativa da presença de micronúcleos nas linhas celulares PANC-1 e Hs 766T, respetivamente, e na (b) e (c) os gráficos com os resultados quantitativos obtidos do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese. Em ambas as linhas celulares, constatou-se um aumento da percentagem de células binucleadas com micronúcleos com os tratamentos, tendo sido atingidos valores mais elevados para o tratamento combinado de 1 μM de olaparib e 2 Gy de raios-X. Estas diferenças foram estatisticamente significativas entre o controlo e o tratamento combinado, no caso geral da presença de micronúcleos e nos casos da presença de 1 e 3 ou mais, tanto na linha celular PANC-1 como na linha celular Hs 766T.

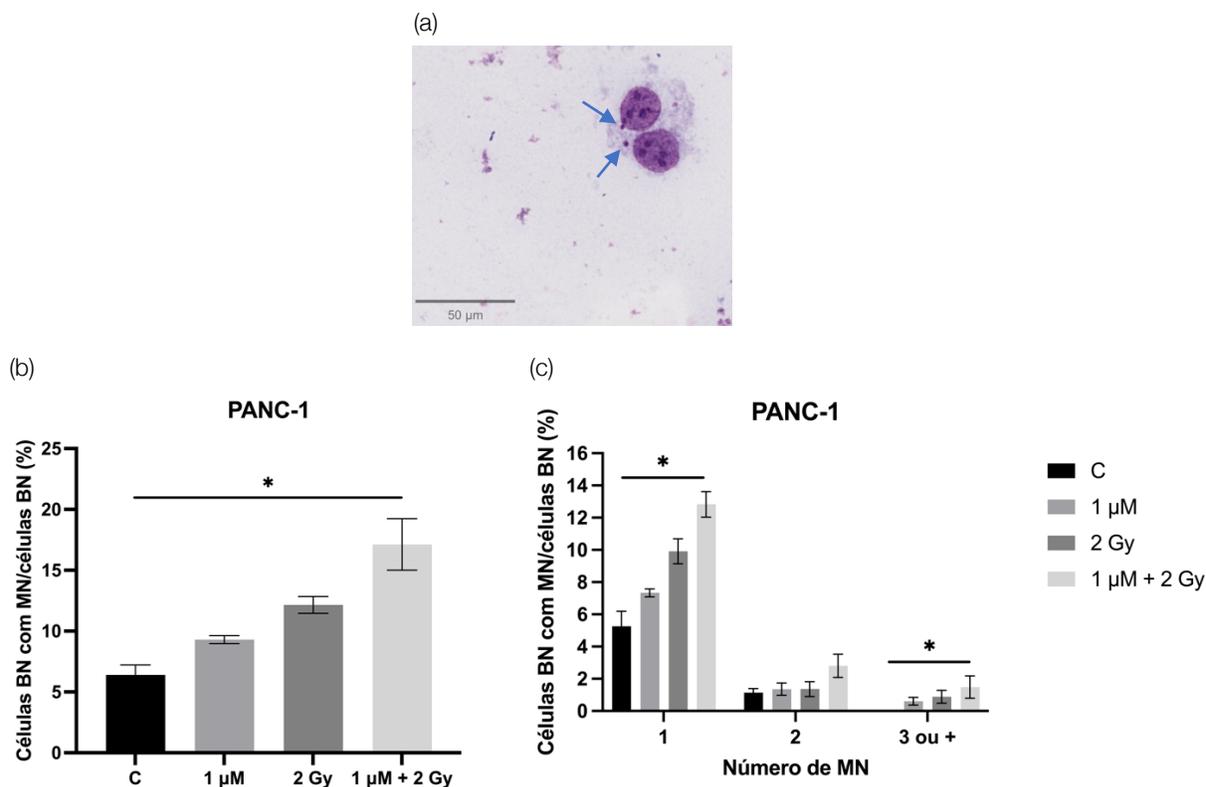


Figura 21: Avaliação da genotoxicidade na linha celular PANC-1: (a) Imagem representativa da presença de micronúcleos (MN) numa célula binucleada (BN); (b) Quantificação de células BN com MN sem tratamento (controlo) e com os tratamentos de 1 μM de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μM de olaparib com 2 Gy de radiação-X; e (c) Quantificação de células BN com 1, 2 e 3 ou mais MN de controlo e com os tratamentos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão da percentagem de células BN com MN de 3 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * que significa $p < 0,05$, determinadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.

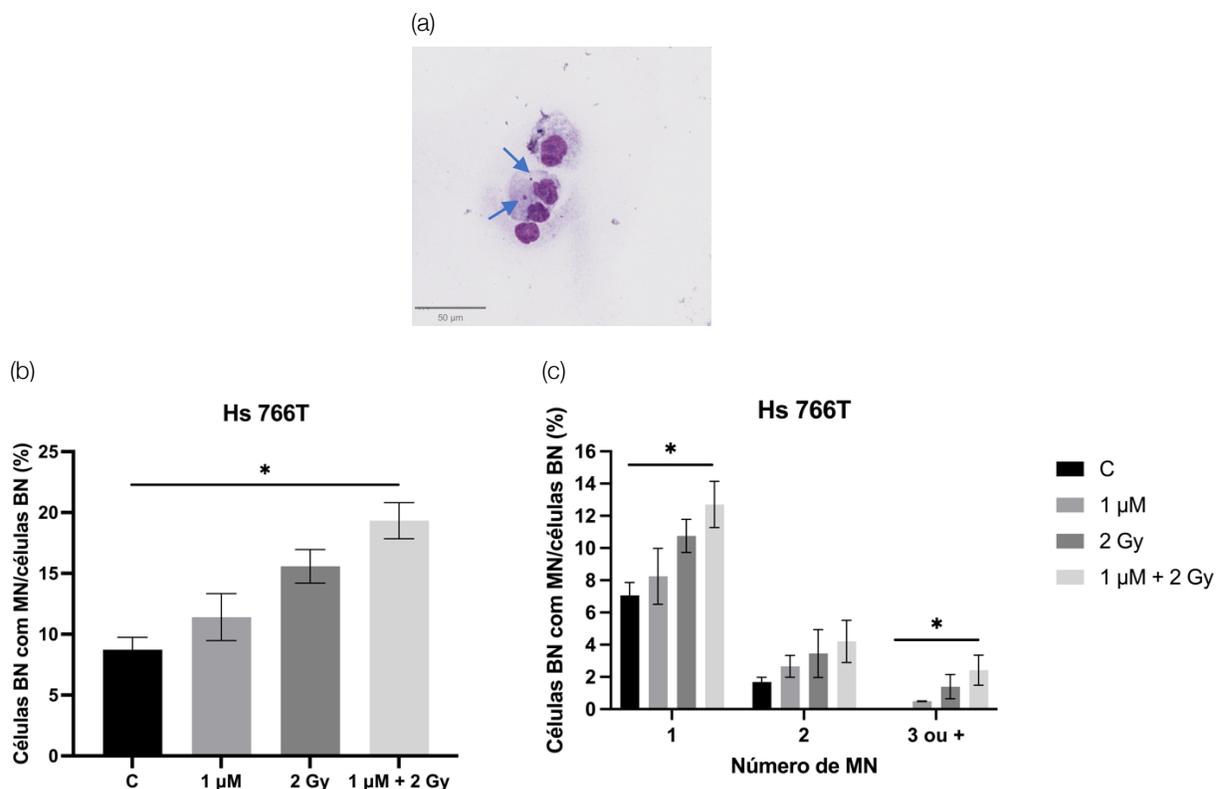


Figura 22: Avaliação da genotoxicidade na linha celular Hs 766T: (a) Imagem representativa da presença de micronúcleos (MN) numa célula binucleada (BN); (b) Quantificação de células BN com MN sem tratamento (controlo) e com os tratamentos de 1 μM de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μM de olaparib com 2 Gy de radiação-X; e (c) Quantificação de células BN com 1, 2 e 3 ou mais MN de controlo e com os tratamentos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão da percentagem de células BN com MN de 3 experiências independentes. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por * que significa $p < 0,05$, determinadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.

4.4 Imunofluorescência

De forma a detetar a presença e a reparação de DSBs foi utilizada a microscopia de fluorescência para quantificar os *foci* dos marcadores de lesões do DNA $\gamma\text{-H2AX}$ e 53BP1 às 2 e 24 horas após a irradiação e/ou administração do olaparib. No entanto, a marcação com o anticorpo 53BP1 não foi bem sucedida, uma vez que se observou uma ausência de sinal. Deste modo, no futuro, deverá ser otimizada a concentração do anticorpo, bem como o tempo e a temperatura de incubação, de forma a melhorar a eficácia da marcação. Além disso, a avaliação de *foci* de $\gamma\text{-H2AX}$ às 2 horas após os tratamentos, apenas foi possível para a linha

celular Hs 766T, uma vez que a linha celular PANC-1 apresentou uma quantidade insuficiente de células nas imagens obtidas. Tal poderá ter sido devido a fatores como: 1) durante a centrifugação a deposição das células não ter sido uniforme, resultando, na deposição de células fora da lamela, uma vez que esta era mais pequena que o poço da placa; 2) a velocidade de centrifugação poderá ter sido baixa e, por isso, insuficiente para depositar as células no fundo do poço; 3) o tempo de centrifugação poderá ter sido muito longo, pelo que as células poderão ter sido submetidas a um stress excessivo; 4) devido à perda de células durante as etapas de lavagem antes da sua fixação, ou ainda, 5) o número de células semeadas ter sido reduzido. Para procedimentos futuros, dever-se-á considerar o aumento do número de células semeadas e utilizar-se uma solução que permita a fixação das células em suspensão sem a remoção do meio de cultura, não sendo, desta maneira, necessário submetê-las à centrifugação.

Na **Figura 24** encontram-se imagens obtidas no microscópio de fluorescência dos núcleos de células da linha celular PANC-1 marcados com DAPI a azul, os *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo a vermelho e a sobreposição das duas marcações, 24 horas após os tratamentos, e na **Figura 24** a quantificação dos respetivos resultados. Relativamente ao gráfico (a) e (b) verificou-se um ligeiro aumento da quantidade de *foci* γ -H2AX por núcleo e de núcleos positivos para γ -H2AX do controlo para os tratamentos, com destaque para o tratamento combinado, o que sugere um aumento de DSBs, contudo não foram encontradas diferenças com significado estatístico. Quanto ao gráfico (c) não se constatarem diferenças na intensidade de fluorescência dos *foci* nas condições de tratamento relativamente à condição de controlo.

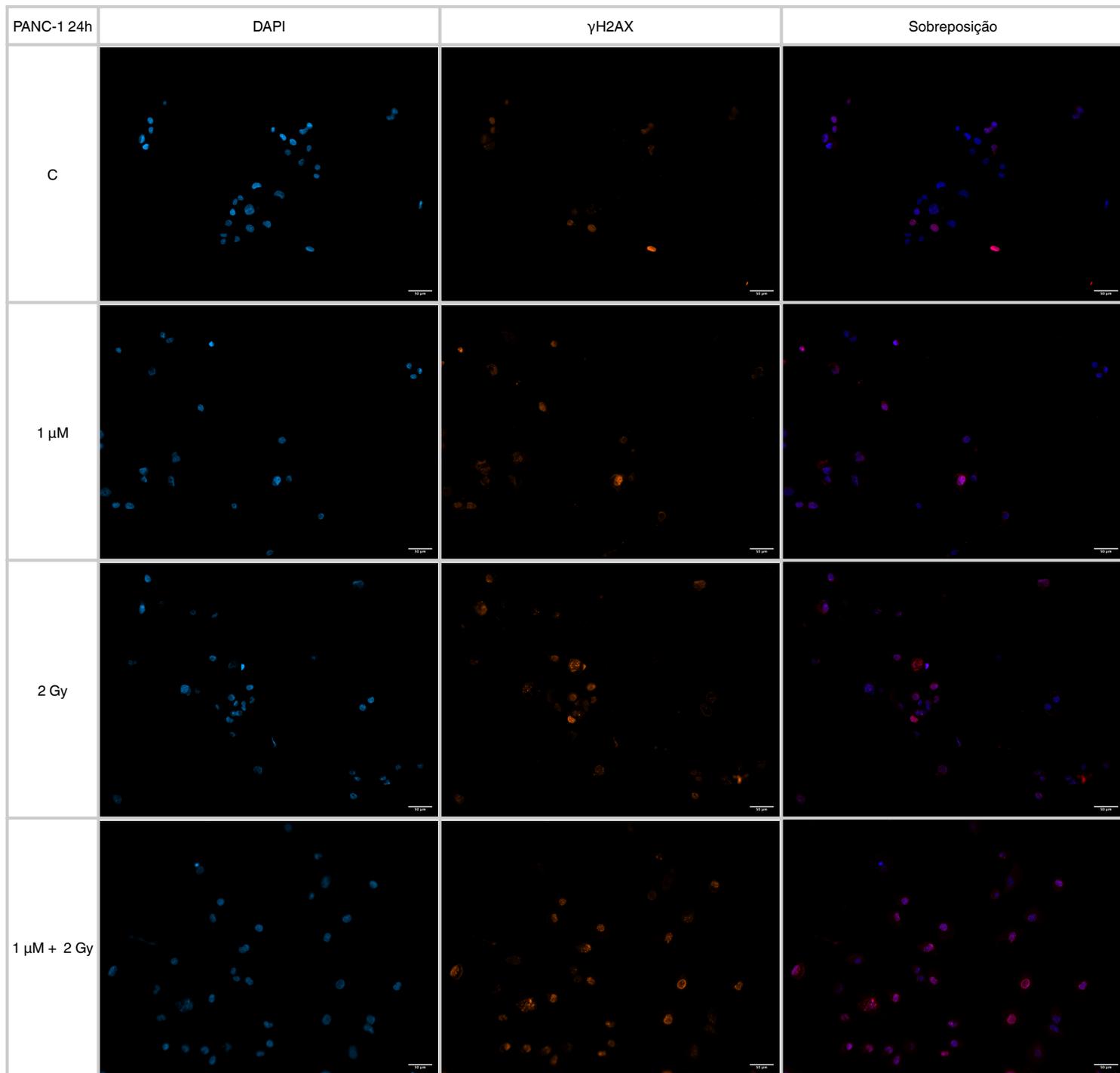


Figura 23: Imagens de imunofluorescência de núcleos de células marcados com DAPI (azul), *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo (vermelho) e sobreposição das duas marcações para a condição de controlo, 1 μ M de olaparib, 2 Gy de raios-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X, 24h após os tratamentos, em células da linha celular PANC-1.

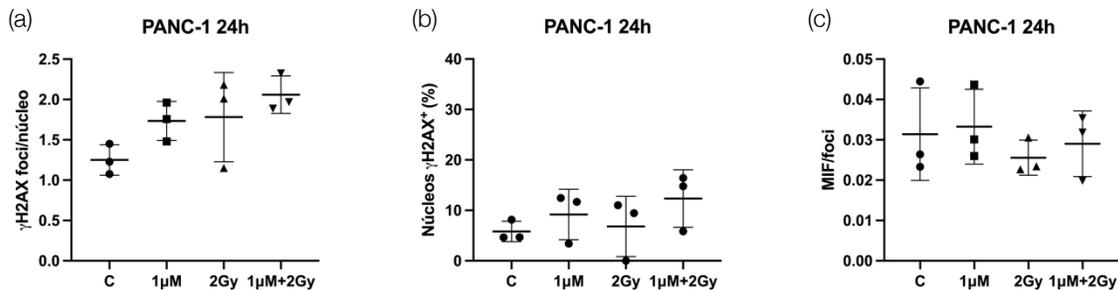


Figura 24: Quantificação de *foci* de γ -H2AX às 24 horas nas células da linha celular PANC-1, para a condição de controlo, tratamento com 1 μ M de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de radiação-X. (a) Número de *foci* de γ -H2AX por núcleo; (b) Percentagem de núcleos positivos para γ -H2AX; e (c) Média da intensidade de fluorescência por *foci*. Os resultados encontram-se expressos como média \pm desvio padrão. A experiência foi realizada 3 vezes em duplicado e não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.

Na **Figura 25** e na **Figura 26** encontram-se imagens obtidas no microscópio de fluorescência dos núcleos de células da linha celular Hs 766T marcados com DAPI a azul, os *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo a vermelho e a sobreposição das duas marcações, 2 e 24 horas após os tratamentos, respetivamente, e na **Figura 27** a quantificação dos respetivos resultados. No entanto, não foram detetadas diferenças em nenhum dos gráficos entre a condição de controlo e as condições de tratamento.

De destacar que os resultados apresentados se tratam de dados preliminares que carecem de validação futura. No entanto, servem de base para otimização da técnica quer a nível experimental quer a nível da análise de dados, servindo para melhorar o *software* utilizado para a quantificação dos *foci*.

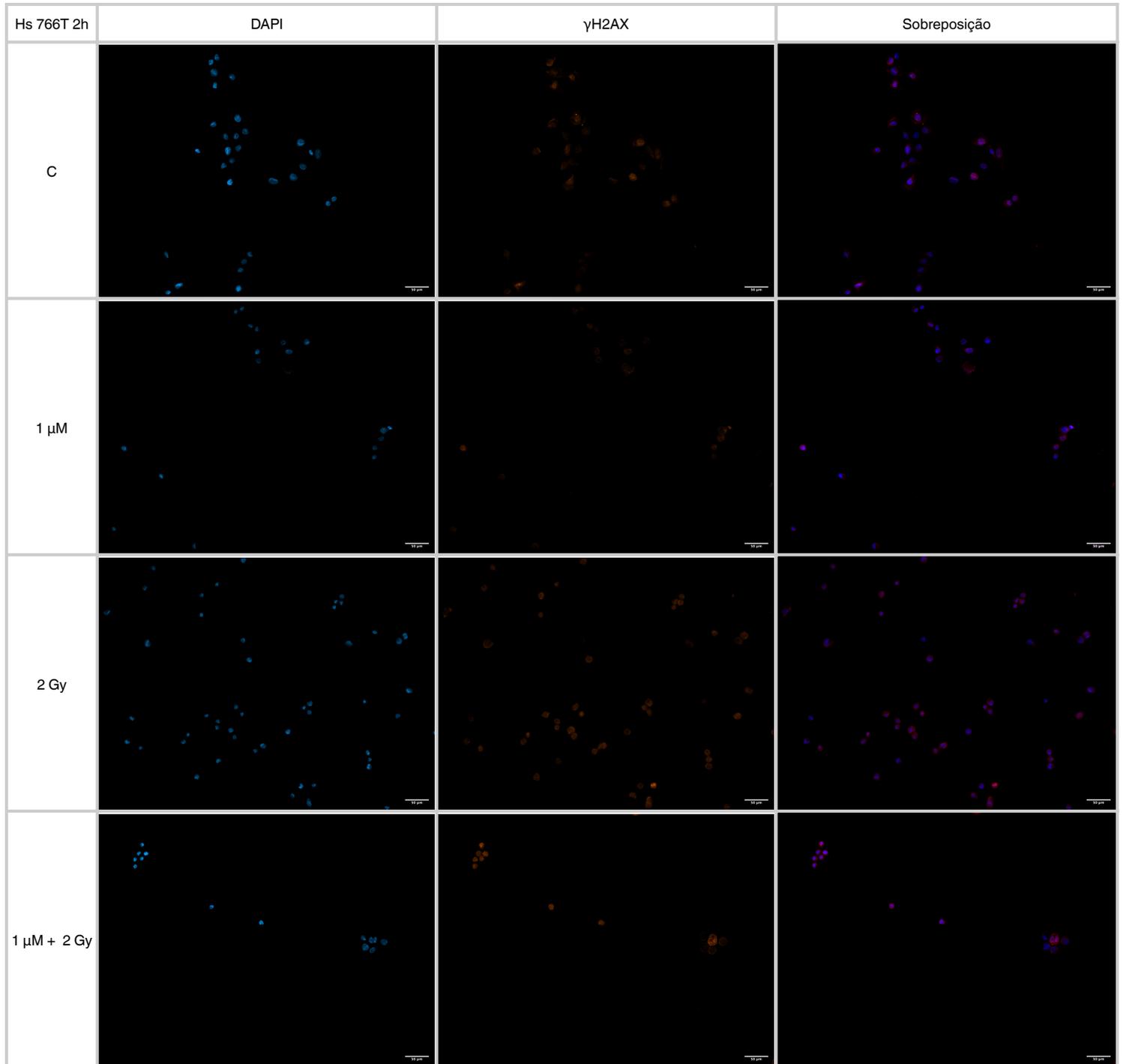


Figura 25: Imagens de imunofluorescência de núcleos de células marcados com DAPI (azul), *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo (vermelho) e sobreposição das duas marcações para a condição de controle, 1 μ M de olaparib, 2 Gy de raios-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X, 2h após os tratamentos, em células da linha celular Hs 766T.

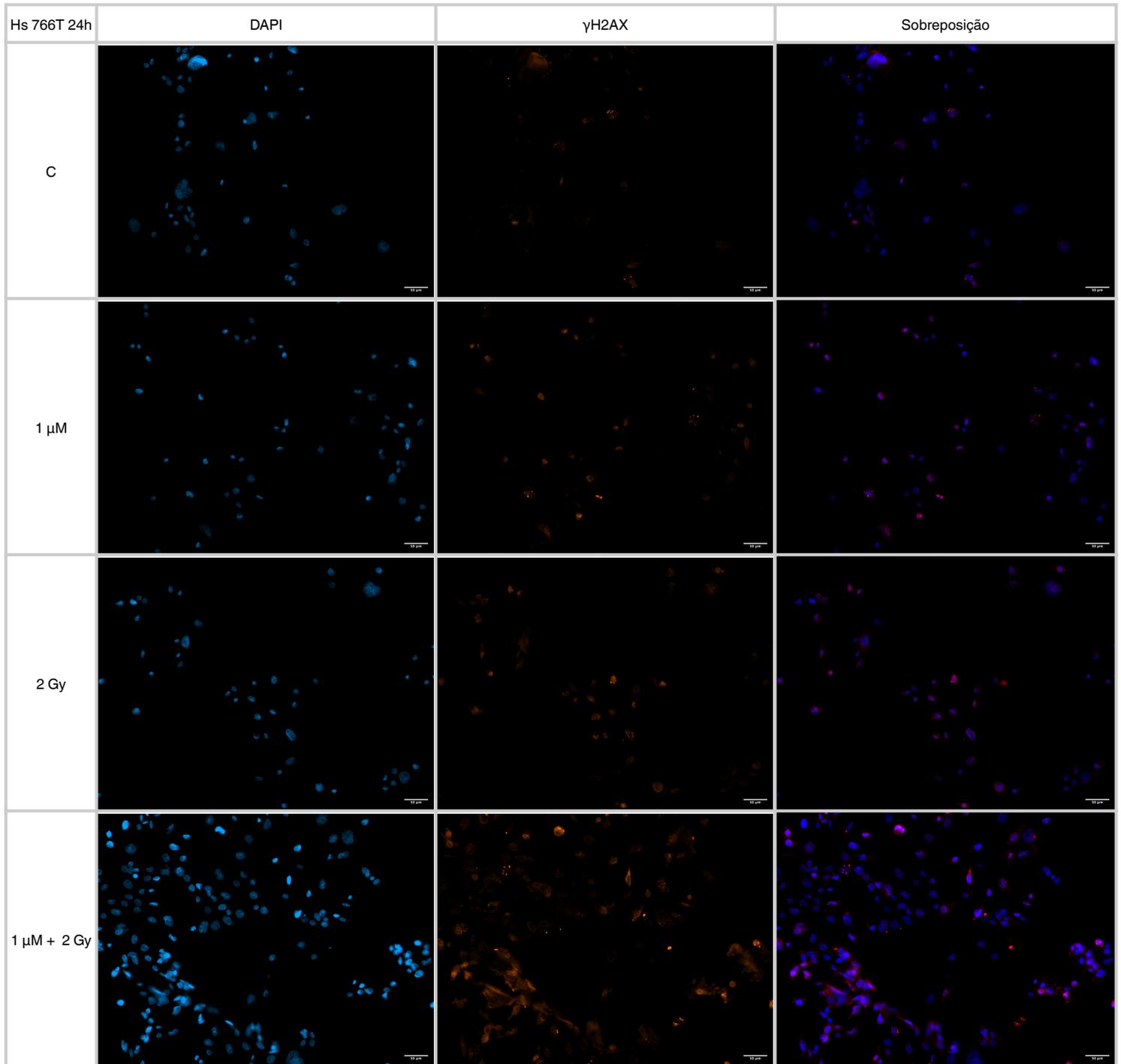


Figura 26: Imagens de imunofluorescência de núcleos de células marcados com DAPI (azul), *foci* γ -H2AX marcados com o anticorpo (vermelho) e sobreposição das duas marcações para a condição de controle, 1 μ M de olaparib, 2 Gy de raios-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X, 24h após os tratamentos, em células da linha celular Hs 766T.

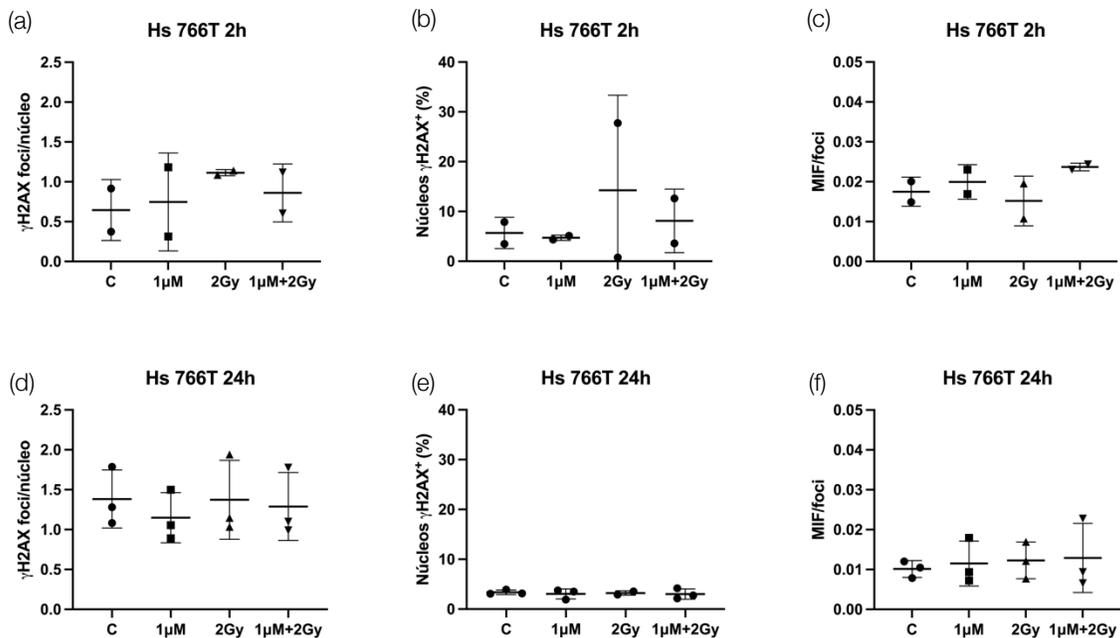


Figura 27: Quantificação de *foci* de γ -H2AX às 2 e 24 horas nas células da linha celular Hs 766T, para a condição de controle, tratamento com 1 μ M de olaparib, 2 Gy de radiação-X e combinação de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de radiação-X. (a) e (d): Número de *foci* de γ -H2AX por núcleo às 2h e 24h, respectivamente; (b) e (e): Percentagem de núcleos positivos para γ -H2AX às 2h e 24h, respectivamente; (c) e (f) Média da intensidade de fluorescência por *foci* às 2h e 24h, respectivamente. Os resultados encontram-se expressos como média \pm desvio padrão. A experiência foi realizada 2 vezes em duplicado no caso das 2h e 3 vezes (n=3) em duplicado no caso das 24h. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Dunn* para comparações múltiplas.

5. Discussão

O cancro do pâncreas apresenta-se como a sexta principal causa de morte por cancro em todo o mundo devido, não só, à sua progressão assintomática e natureza agressiva, mas também à falta de opções terapêuticas eficazes [13,15,16]. As atuais opções terapêuticas para este tipo de cancro incluem a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia [35]. No entanto, a única abordagem potencialmente curativa é a cirurgia, que só é possível se o tumor for ressecável, ou seja, para uma pequena percentagem de doentes, uma vez que a maioria dos casos são diagnosticados em estádios localmente avançados ou metastáticos [38]. Desta maneira, é fulcral o surgimento de novas abordagens terapêuticas para o cancro do pâncreas.

A radioterapia é um dos tipos de tratamento do cancro mais utilizados, a qual envolve o uso de radiação ionizante direcionada ao local do tumor para destruir as células tumorais. No caso do cancro do pâncreas, esta é utilizada em combinação com quimioterapia como terapia neoadjuvante em tumores de estágio “*borderline resectable*”, de forma a reduzir o tamanho do tumor para uma ressecção com margens mais claras [28]. Os iPARP têm sido estudados como estratégia terapêutica de vários tipos de cancro. O olaparib está aprovado para o tratamento do cancro do pâncreas metastático em doentes com mutação nos genes *BRCA1/2*, que tenham respondido positivamente a 16 semanas de quimioterapia à base de platina [71]. Assim, este projeto assenta na combinação de radioterapia de raios-X com o olaparib, de forma a determinar o seu possível efeito sinérgico, uma vez que se espera que esta combinação terapêutica induza uma sobrecarga de lesões no DNA, com consequente morte das células tumorais.

Numa fase inicial do projeto, procedeu-se à obtenção das curvas de crescimento e consequente determinação do tempo de duplicação da população das duas linhas celulares utilizadas neste estudo, a linha celular PANC-1 e a linha celular Hs 766T. As curvas de crescimento de ambas as linhas celulares mostram que, às 24h, o número de células vivas contadas foi menor que o número de células semeadas inicialmente, o que pode ser devido ao facto de em 24h nem todas as células semeadas terem aderido à nova superfície de cultura e por estas ainda se encontrarem na fase de latência, que é um período de adaptação e preparação, em que ainda não ocorrem divisões celulares [87]. A diferença obtida entre os valores de DT obtidos para as duas linhas celulares poderá dever-se ao facto da linha celular PANC-1 apresentar mutação no gene *TP53*, com perda de função, enquanto as células da linha celular Hs 766T não possuem esta mutação [79,83,108]. Este gene codifica a proteína P53, que regula a divisão celular, impedindo que as células se dividam de forma anormal e

descontrolada [109]. Desta maneira, faz sentido que uma linha celular com mutação neste gene como a linha celular PANC-1, cresça mais rapidamente que uma linha celular que não apresente este tipo de mutação, como é o caso da Hs 766T.

Relativamente ao tempo de duplicação obtido para a linha celular PANC-1, que foi de $44,56 \pm 6,79$ horas, McCluskey *et al.* obtiveram o valor de $21,00 \pm 1,06$ horas, Wang *et al.* de $25,83 \pm 2,03$ horas e Miura *et al.* de $25,80 \pm 2,80$ [110–112]. Para a linha celular Hs 766T foi obtido um tempo de duplicação de $58,80 \pm 8,73$ horas enquanto Cowley *et al.* obtiveram o valor de 30 horas [113]. No entanto, estes estudos utilizaram condições iniciais diferentes, tais como o número inicial de células semeadas, a área disponível de crescimento, as condições de crescimento das células e os tempos de incubação, bem como metodologias diferentes para a determinação do tempo de duplicação. Para a linha celular PANC-1, o repositório alemão de linhas celulares reporta um tempo de duplicação entre 40-45 horas, intervalo onde se encontra o valor obtido no presente estudo [114].

De seguida, avaliou-se a sobrevivência celular após os tratamentos de radioterapia em monoterapia, olaparib em monoterapia e radioterapia combinada com $1 \mu\text{M}$ de olaparib, através do ensaio clonogénico, para ambas as linhas celulares. Além disso, para o tratamento com olaparib em monoterapia e para o tratamento combinado foi avaliada a diferença do efeito do olaparib na sobrevivência celular a curto (72h de incubação) ou longo prazo (incubação durante todo o ensaio).

No caso do tratamento com olaparib em monoterapia, as curvas de sobrevivência e os valores de IC_{50} obtidos mostraram que, para a linha celular PANC-1, a estratégia de deixar o olaparib em contacto com as células durante todo o tempo de incubação foi mais eficaz na redução da sobrevivência celular que apenas 72h, enquanto que para a linha celular Hs 766T não se verificou uma diferença significativa de eficácia entre as duas abordagens nas concentrações mais baixas de olaparib. Comparando as duas linhas celulares, as células da linha celular PANC-1 foram mais sensíveis ao tratamento com olaparib em monoterapia que nas células da linha celular Hs 766T.

Os resultados obtidos neste ensaio corroboram ainda que a concentração de $1 \mu\text{M}$ de olaparib, em regime de monoterapia, não diminuiu a sobrevivência celular significativamente quando o inibidor permanece em contacto com as células da linha celular PANC-1 apenas 72h ou independentemente do período de contacto para a linha celular Hs 766T. Assim,

confirma-se que, nestes casos, esta concentração não foi citotóxica por si só. No entanto, para comprovar que esta concentração é suficiente para inibir a PARP, como referido na literatura, futuramente deverão ser realizados ensaios adicionais a fim de avaliar a atividade enzimática da PARP como, por exemplo, avaliar a formação da cadeia PAR por *western blot* ou imunofluorescência.

Por último, o ensaio clonogénico evidenciou ainda que o tratamento combinado de radioterapia com olaparib obteve melhores resultados, em termos de diminuição da sobrevivência celular, que o tratamento de radioterapia em monoterapia para ambas as linhas celulares. No tratamento combinado, foram obtidos valores de α mais altos, que indicam uma maior suscetibilidade das células a lesões letais, e valores de β mais baixos, que sugerem uma diminuição da contribuição das lesões sub-letais, pelo que ocorreu uma maior radiosensibilização das células com o tratamento combinado, especialmente na estratégia de permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação. Para a linha celular PANC-1, no tratamento combinado, constatou-se que a estratégia de permanência do inibidor em contacto com as células durante todo o tempo de incubação teve uma melhor eficácia na redução do fator de sobrevivência que a estratégia de permanência do inibidor em contacto com as células durante apenas 72h, no entanto, para a linha celular Hs 766T não se verificou uma diferença significativa de eficácia entre as duas abordagens testadas de tratamento combinado. Além disso, ambas as estratégias de tratamento combinado foram mais eficazes na linha celular PANC-1 como comprovado pelos valores mais altos de SER quando comparados com os obtidos para a linha celular Hs 766T.

Uma possível justificação para as diferenças na eficácia dos tratamentos entre as duas linhas celulares prende-se ao facto das células da linha celular PANC-1 apresentarem mutação no gene *TP53*, pelo que a sua capacidade de reparar lesões no DNA é comprometida. A proteína P53 atua como guardião do genoma, iniciando respostas celulares que podem levar à reparação de lesões no DNA ou à indução da morte celular programada se a lesão for irreparável [115]. Assim, a inibição prolongada da PARP impede ainda mais a reparação das lesões causadas pela radiação, resultando numa sobrecarga de lesões que leva à morte celular. Pelo mesmo racional, como a linha celular Hs 766T não apresenta mutação no gene *TP53*, significa que tem a proteína P53 funcional, permitindo-lhe ativar respostas a lesões no DNA. Desta maneira, estas células têm uma melhor capacidade de reparar lesões no DNA mesmo com uma inibição prolongada da PARP. Além disso, a linha celular PANC-1 divide-se

mais rapidamente e é menos diferenciada que a linha celular Hs 766T, pelo que, segundo a Lei de *Bergonie e Tribondeau* é mais suscetível aos efeitos da radiação ionizante [39].

Os valores de SER maiores que um comprovaram então que o olaparib radiosensibilizou as células das duas linhas celulares, permitindo uma redução de dose de radiação quando comparada com a radioterapia isolada.

Bright *et al.* realizaram um estudo semelhante, onde também foi avaliada a eficácia do tratamento combinado de raios-X com 1 μM de olaparib em várias linhas celulares de cancro, nomeadamente a linha celular PANC-1 [116]. No entanto, os procedimentos não foram iguais aos utilizados neste estudo, e é de realçar que no estudo de Bright *et al.* o inibidor esteve em contacto com as células apenas 24h (6-8h antes da irradiação e 16-18h após a irradiação) [116]. Este estudo concluiu que o iPARP radiosensibilizou significativamente várias linhas celulares de diferentes tipos de cancro, incluindo a linha celular PANC-1, onde foram obtidos os valores de $\text{SER}_{\text{D}_{10}} = 1,46 \pm 0,05$; $\text{SER}_{\text{D}_{50}} = 1,80 \pm 0,19$; $\text{SER}_{\text{MID}} = 1,60 \pm 0,09$ e $\text{SER}_{\text{FS}_{2\text{Gy}}} = 1,62 \pm 0,14$ com o tratamento combinado de raios-X com 1 μM de olaparib relativamente ao tratamento de radioterapia em monoterapia [116]. Um outro estudo de Wéra *et al.* também relataram a capacidade do olaparib radiosensibilizar as células da linha celular PANC-1 aos raios-X [117]. Neste estudo, o ensaio clonogénico também teve a duração de 12 dias, no entanto, foi administrado às células 0,5 μM de olaparib 3-4 horas antes da irradiação com raios-X e o inibidor esteve em contacto com as células durante 24 horas após a irradiação [117]. Assim, apesar das diferenças existentes entre os procedimentos utilizados, as descobertas de Bright *et al.* e de Wéra *et al.* corroboram os resultados obtidos neste estudo [116,117].

De seguida, a genotoxicidade dos tratamentos foi avaliada através do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese, que permitiu constatar que, em ambas as linhas celulares, o tratamento combinado de 1 μM de olaparib com 2 Gy de raios-X causa lesões no DNA, uma vez que induziu um maior número de células binucleadas com micronúcleos, relativamente ao controlo e aos tratamentos em monoterapia. Assim, os resultados deste ensaio permitiram concluir que o tratamento combinado apresentou uma maior genotoxicidade que os tratamentos em monoterapia. Um estudo de Kobayashi *et al.* também comprovou um aumento significativo de micronúcleos em amostras de doentes com cancro do colo do útero após a radioterapia de raios-X [118]. Neste estudo foi realizada uma biopsia

tumoral antes do início da radioterapia e após a exposição a 10 Gy de raios-X (2 Gy por fração por 5 frações) nos mesmos doentes, tendo o intervalo entre a primeira e a segunda biópsia variado de 4 a 10 dias. O número mediano de núcleos com micronúcleos antes da radioterapia foi de 28 e depois da radioterapia foi de 151, pelo que o número de núcleos com micronúcleos foi significativamente maior em amostras submetidas aos raios-X que em amostras sem tratamento. Desta maneira, no que diz respeito aos efeitos da radioterapia, os resultados obtidos no presente estudo encontram-se em concordância com os obtidos por Kobayashi *et al.* [118].

Na deteção da formação e reparação de DSBs através do ensaio de imunofluorescência, na linha celular PANC-1, constatou-se que o tratamento combinado de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de raios-X induziu uma maior quantidade de *foci* γ -H2AX por núcleo e de núcleos positivos para γ -H2AX que o controlo e os tratamentos em monoterapia. Isto sugere que ocorreu uma maior indução de DSBs no DNA, uma vez que uma DSB corresponde a um *foci* de γ -H2AX [106]. Contudo na linha celular Hs 766T não foi encontrada nenhuma tendência de resposta entre condições de tratamento e de controlo pelo que os resultados não permitem uma interpretação robusta. Relativamente à marcação 53BP1, que não resultou, seria expectável que o tratamento combinado levasse também a um aumento de *foci* 53BP1 relativamente aos tratamentos em monoterapia, uma vez que a presença de *foci* 53BP1 que se co-localizam com *foci* γ -H2AX reforçam a presença de DSBs no DNA. Um estudo de Hastak *et al.* que combinou 10 μ M do iPARP LT626 com 2 Gy de radiação- γ em duas linhas celulares de cancro do pâncreas (MIA PaCa-2 e PDA), mostrou que o tratamento com radiação em monoterapia levou a um aumento de *foci* γ -H2AX, tendo sido atingido o valor máximo 4-8h após a irradiação e diminuído nas 24h, mas com o tratamento combinado do iPARP com a radiação os *foci* γ -H2AX aumentaram em função do tempo [119]. Além disso, neste estudo também foram analisados *foci* 53BP1 e foi constatado que o tratamento combinado aumentou ainda mais o número destes *foci*, em função do tempo, que os tratamentos isolados [119]. Hastak *et al.* associaram o aumento de *foci* destes dois marcadores de DSBs à reparação ineficiente do DNA que leva a lesões significativas [119]. Ressalva-se que os resultados obtidos neste ensaio são resultados preliminares e necessitam de ser validados, servindo, no entanto, de base para a otimização da técnica. Além disso, seria importante complementar este estudo com avaliações noutros períodos de tempo como às 4h, 8h, 12h e 48h, de forma a monitorizar

a existência ou não de reparação das DSBs no DNA, para uma melhor interpretação do significado biológico.

A integração de todos os resultados obtidos parece validar a hipótese postulada que deu origem a este trabalho, na medida em que se mostrou que o olaparib consegue radiosensibilizar as células de cancro do pâncreas aos raios-X, tendo o tratamento combinado uma melhor eficácia antitumoral que os tratamentos isolados, uma vez que induz uma acumulação de lesões no DNA, que sobrecarregam os mecanismos de reparação das células tumorais, levando-as à morte celular. Adicionalmente, estes dados parecem ser bastante promissores para a prática clínica sugerindo que a combinação de olaparib e radiação-X pode ser uma nova opção de tratamento eficaz para o cancro do pâncreas.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

O prognóstico para o cancro do pâncreas é geralmente reservado devido à natureza agressiva da doença e à falta de opções de diagnóstico e tratamento eficazes. Assim, é de extrema importância encontrar novas opções terapêuticas eficazes, capazes de aumentar a sobrevivência geral associada a este tipo de cancro.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico da combinação de radioterapia com olaparib nas linhas celulares de cancro do pâncreas PANC-1 e Hs 766T. Primeiramente, avaliou-se a sobrevivência celular após a exposição das células de ambas as linhas celulares aos tratamentos de radioterapia em monoterapia, olaparib em monoterapia e combinação simultânea de 1 μ M de olaparib com doses crescentes de raios-X. Para o caso do tratamento com olaparib em monoterapia e do tratamento combinado foram testadas duas abordagens: a permanência do olaparib durante todo o tempo de incubação e a sua remoção 72h após a sua administração, que serviram para avaliar a diferença do efeito do olaparib na sobrevivência celular a curto (72h de incubação) ou longo prazo (incubação durante todo o ensaio). Os valores de SER maiores que um comprovaram que o olaparib radiosensibilizou as células de ambas as linhas celulares, permitindo uma redução de dose de radiação quando comparada com a radioterapia isolada, tendo sido atingidos valores mais altos quando o olaparib permanecia em contacto com as células durante todo o tempo de incubação, sugerindo uma melhor eficácia desta abordagem. Numa segunda fase, avaliaram-se os efeitos dos tratamentos em monoterapia e em combinação a nível do DNA. Assim, foi avaliada a genotoxicidade dos tratamentos com 1 μ M de olaparib e 2 Gy de radiação-X em monoterapia e combinação, onde foi demonstrado que o tratamento combinado apresentou uma maior capacidade de induzir lesões no DNA, que levam à morte das células tumorais, que os tratamentos isolados, em ambas as linhas celulares. Estes resultados foram ainda validados pela deteção da presença de DSBs através da quantificação de *foci* γ -H2AX, constatando-se que o tratamento combinado induziu uma maior quantidade de DSBs na linha celular PANC-1 que os tratamentos isolados.

Foi possível concluir que o olaparib é capaz de radiosensibilizar as células de cancro do pâncreas aos raios-X, permitindo uma redução de dose de radiação quando comparada com o regime de monoterapia, e que o tratamento combinado de 1 μ M de olaparib com 2 Gy de radiação-X induz mais lesões no DNA, incluindo DSBs, que os tratamentos isolados.

Como perspetivas futuras, destaca-se a importância de comprovar que a concentração de 1 μ M de olaparib é suficiente para inibir a PARP, como referido na literatura, através da

avaliação da formação da cadeia PAR por *western blot* ou imunofluorescência. Também seria relevante complementar o estudo de imunofluorescência com avaliações noutros períodos de tempo de forma a monitorizar melhor a existência ou não de reparação das DSBs no DNA. Poderá ainda avaliar-se a viabilidade celular, perfil de morte celular e ciclo celular após os tratamentos através do ensaio de citometria de fluxo e os tipos de lesões causadas no DNA através do *fast halo assay*. Seria também interessante estudar os efeitos do tratamento combinado em modelos celulares 3D como esferoides, que melhor mimetizam o microambiente tumoral, bem como numa linha celular normal de órgãos adjacentes, de forma a averiguar se o olaparib radiosensibiliza os tecidos saudáveis adjacentes da mesma forma que radiosensibiliza o tumor, e realizar estudos *in vivo*. De forma a complementar os resultados obtidos no presente estudo, seria também interessante avaliar combinações sequencias dos tratamentos, administrando o olaparib antes ou depois da radioterapia.

Em suma, este trabalho evidenciou que a combinação da radioterapia com o olaparib poderá ser uma estratégia terapêutica válida e eficaz para o tratamento do cancro do pâncreas, constituindo um acréscimo às opções terapêuticas utilizadas atualmente na prática clínica.

7. Bibliografia

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
2. Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. In: Sunderland (MA), ed. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd Edition. Sinauer Associates; 2000. Accessed February 15, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. An Overview of the Cell Cycle. In: *Molecular Biology of the Cell*. Vol 4th edition. Garland Science; 2002. Accessed April 3, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
4. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:29. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2
5. Leung PS. Overview of the pancreas. In: *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 690. Springer, Dordrecht; 2010:3-12. doi:10.1007/978-90-481-9060-7_1/COVER
6. Definition of pancreas - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. Accessed January 2, 2024. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/pancreas>
7. Sayed SA El, Mukherjee S. *Physiology, Pancreas*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed January 7, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
8. Mehta V, Hopson PE, Smadi Y, Patel SB, Horvath K, Mehta DI. Development of the human pancreas and its exocrine function. *Front Pediatr.* 2022;10:909648. doi:10.3389/FPED.2022.909648/BIBTEX
9. Talathi SS, Zimmerman R, Young M. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed January 2, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532912/>
10. Taher A, Mujtaba B, Ramani NS, Patel A, Morani AC. The Postoperative Pancreas Imaging. *Journal of Gastrointestinal and Abdominal Radiology.* 2020;3(01):087-098. doi:10.1055/S-0040-1701747
11. Corbo V, Tortora G, Scarpa A. Molecular Pathology of Pancreatic Cancer: From Bench-to-Bedside Translation. *Curr Drug Targets.* 2012;13(6):744. doi:10.2174/138945012800564103

12. Peixoto RDA, Speers C, MCGahan CE, Renouf DJ, Schaeffer DF, Kennecke HF. Prognostic factors and sites of metastasis in unresectable locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Med.* 2015;4(8):1171. doi:10.1002/CAM4.459
13. Ilic I, Ilic M. International patterns in incidence and mortality trends of pancreatic cancer in the last three decades: A joinpoint regression analysis. *World J Gastroenterol.* 2022;28(32):4698. doi:10.3748/WJG.V28.I32.4698
14. Bazeed AY, Day CM, Garg S. Pancreatic Cancer: Challenges and Opportunities in Locoregional Therapies. *Cancers* 2022, Vol 14, Page 4257. 2022;14(17):4257. doi:10.3390/CANCERS14174257
15. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Published 2024. Accessed February 2, 2024. <https://gco.iarc.fr/today>
16. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* Published online April 4, 2024. doi:10.3322/CAAC.21834
17. Ilic I, Ilic M. International patterns in incidence and mortality trends of pancreatic cancer in the last three decades: A joinpoint regression analysis. *World J Gastroenterol.* 2022;28(32):4698. doi:10.3748/WJG.V28.I32.4698
18. Risk Factor. *Encyclopedia of Public Health*. Published online 2008:1264-1264. doi:10.1007/978-1-4020-5614-7_3038
19. 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
20. 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
21. Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(7):493. doi:10.1038/S41575-021-00457-X

22. Luchini C, Grillo F, Fassan M, et al. Malignant epithelial/exocrine tumors of the pancreas. *Pathologica*. 2020;112(3):210. doi:10.32074/1591-951X-167
23. Ro C, Chai W, Yu VE, Yu R. Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin J Cancer*. 2013;32(6):312. doi:10.5732/CJC.012.10295
24. Radu EC, Saizu AI, Grigorescu RR, Croitoru AE, Gheorghe C. Metastatic neuroendocrine pancreatic tumor – Case report. *J Med Life*. 2018;11(1):57. Accessed April 6, 2024. /pmc/articles/PMC5909947/
25. Niger M, Prisciandaro M, Antista M, et al. One size does not fit all for pancreatic cancers: A review on rare histologies and therapeutic approaches. *World J Gastrointest Oncol*. 2020;12(8):833. doi:10.4251/WJGO.V12.I8.833
26. Sarantis P, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis M V. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol*. 2020;12(2):173. doi:10.4251/WJGO.V12.I2.173
27. 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
28. Bazeed AY, Day CM, Garg S. Pancreatic Cancer: Challenges and Opportunities in Locoregional Therapies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17). doi:10.3390/CANCERS14174257
29. Kang H, Kim SS, Sung MJ, et al. Evaluation of the 8th Edition AJCC Staging System for the Clinical Staging of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19). doi:10.3390/CANCERS14194672/S1
30. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*. 2022;163(2):386-402.e1. doi:10.1053/J.GASTRO.2022.03.056
31. Kanji ZS, Gallinger S. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *CMAJ Canadian Medical Association Journal*. 2013;185(14):1219-1226. doi:10.1503/CMAJ.121368/-/DC1

32. Rogowska AZ. Ultrasound-guided Percutaneous Core-needle Biopsy of Focal Pancreatic Lesions – Practical Aspectss. *J Ultrason.* 2022;22(89):117. doi:10.15557/JOU.2022.0019
33. Pancreatic Cancer Diagnosis | MD Anderson Cancer Center. Accessed February 6, 2024. <https://www.mdanderson.org/cancer-types/pancreatic-cancer/pancreatic-cancer-diagnosis.html>
34. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K. Diagnosis of pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2006;8(5):337. doi:10.1080/13651820500540949
35. Zhao ZY, Liu W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technol Cancer Res Treat.* 2020;19. doi:10.1177/1533033820962117/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1533033820962117-FIG1.JPEG
36. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2018;24(43):4846. doi:10.3748/WJG.V24.I43.4846
37. Brant JM, Haas-Haseman ML, Wei SH, Wickham R, Brana Reynolds R, Folloder J. Clinical Management of Pancreatic Cancer. *J Adv Pract Oncol.* 2014;5(5):356. doi:10.4324/9781315374499
38. Soloff E V., Zaheer A, Meier J, Zins M, Tamm EP. Staging of pancreatic cancer: resectable, borderline resectable, and unresectable disease. *Abdominal Radiology.* 2018;43(2):301-313. doi:10.1007/S00261-017-1410-2/FIGURES/9
39. Baatout S, ed. *Radiobiology Textbook.* Springer International Publishing; 2023. doi:10.1007/978-3-031-18810-7
40. Tubiana M. [Wilhelm Conrad Röntgen and the discovery of X-rays]. *Bull Acad Natl Med.* 1996;180(1):97-108.
41. Tuieng RJ, Cartmell SH, Kirwan CC, Sherratt MJ. The Effects of Ionising and Non-ionising Electromagnetic Radiation on Extracellular Matrix Proteins. *Cells.* 2021;10(11). doi:10.3390/CELLS10113041

42. Omer H. Radiobiological effects and medical applications of non-ionizing radiation. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(10):5585. doi:10.1016/J.SJBS.2021.05.071
43. Joiner MC, van der Kogel AJ, eds. *Basic Clinical Radiobiology.* (Eds.). (2018). *Basic Clinical Radiobiology* (5th ed.). CRC Press doi:10.1201/9780429490606
44. Hur W, Yoon SK. Molecular Pathogenesis of Radiation-Induced Cell Toxicity in Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol 18, Page 2749. 2017;18(12):2749. doi:10.3390/IJMS18122749
45. Chang DS, Lasley FD, Das IJ, Mendonca MS, Dynlacht JR. *Basic Radiotherapy Physics and Biology.* *Basic Radiotherapy Physics and Biology.* Published online 2014. doi:10.1007/978-3-319-06841-1
46. Murshed H. *Radiation Biology. Fundamentals of Radiation Oncology.* Published online January 1, 2019:57-87. doi:10.1016/B978-0-12-814128-1.00003-9
47. Moon J, Kitty I, Renata K, Qin S, Zhao F, Kim W. DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 4741. 2023;24(5):4741. doi:10.3390/IJMS24054741
48. Kaelin WG. The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer* 2005 5:9. 2005;5(9):689-698. doi:10.1038/nrc1691
49. Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G, Prise KM. DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective. <https://home.liebertpub.com/ars>. 2013;18(18):2458-2472. doi:10.1089/ARS.2012.5151
50. Roobol SJ, van den Bent I, van Cappellen WA, et al. Comparison of High- and Low-LET Radiation-Induced DNA Double-Strand Break Processing in Living Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):1-19. doi:10.3390/IJMS21186602
51. 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. doi:10.7150/IJMS.3635
52. Lepareur N, Ramée B, Mougin-Degraef M, Bourgeois M. *Clinical Advances and Perspectives in Targeted Radionuclide Therapy.* *Pharmaceutics.* 2023;15(6). doi:10.3390/PHARMACEUTICS15061733

53. Seeman J, Schulte D, Delahaye JP, et al. Design and Principles of Linear Accelerators and Colliders. In: Myers, S., Schopper, H. (Eds) Particle Physics Reference Library. Springer, Cham. Vol 3.; 2020. doi:10.1007/978-3-030-34245-6_7/TABLES/8
54. TrueBeam | Varian. Accessed February 6, 2024. <https://www.varian.com/pt-pt/products/radiotherapy/treatment-delivery/truebeam>
55. Li LY, Guan Y Di, Chen XS, Yang JM, Cheng Y. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Front Pharmacol.* 2021;11:629266. doi:10.3389/FPHAR.2020.629266/BIBTEX
56. Moon J, Kitty I, Renata K, Qin S, Zhao F, Kim W. DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 4741. 2023;24(5):4741. doi:10.3390/IJMS24054741
57. Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, Richard DJ, Bolderson E. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:564601. doi:10.3389/FCCELL.2020.564601/BIBTEX
58. Morales JC, Li L, Fattah FJ, et al. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014;24(1):15. doi:10.1615/CRITREVEUKARYOTGENEEXPR.2013006875
59. Zheng F, Zhang Y, Chen S, Weng X, Rao Y, Fang H. Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2020;123:109661. doi:10.1016/J.BIOPHA.2019.109661
60. Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer.* 2011;30(7):463. doi:10.5732/CJC.011.10111
61. Javle M, Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer.* 2011;105(8):1114. doi:10.1038/BJC.2011.382
62. Zhu H, Wei M, Xu J, et al. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer.* 2020;19(1). doi:10.1186/S12943-020-01167-9

63. Branco C, Paredes J. PARP Inhibitors: From the Mechanism of Action to Clinical Practice. *Acta Med Port.* 2022;35(2):135-143. doi:10.20344/AMP.13870
64. Lynparza | European Medicines Agency. Accessed April 23, 2024. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lynparza>
65. Sun C, Chu A, Song R, et al. PARP inhibitors combined with radiotherapy: are we ready? *Front Pharmacol.* 2023;14:1234973. doi:10.3389/fphar.2023.1234973
66. Valabrega G, Scotto G, Tuninetti V, Pani A, Scaglione F. Differences in PARP Inhibitors for the Treatment of Ovarian Cancer: Mechanisms of Action, Pharmacology, Safety, and Efficacy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8). doi:10.3390/IJMS22084203
67. Chan WY, Brown LJ, Reid L, Joshua AM. PARP Inhibitors in Melanoma—An Expanding Therapeutic Option? *Cancers* 2021, Vol 13, Page 4520. 2021;13(18):4520. doi:10.3390/CANCERS13184520
68. Rivero Belenchón I, Congregado Ruiz CB, Saez C, Osman García I, Medina López RA. Parp Inhibitors and Radiotherapy: A New Combination for Prostate Cancer (Systematic Review). *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 12978. 2023;24(16):12978. doi:10.3390/IJMS241612978
69. Ragupathi A, Singh M, Perez AM, Zhang D. Targeting the BRCA1/2 deficient cancer with PARP inhibitors: Clinical outcomes and mechanistic insights. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11. doi:10.3389/FCCELL.2023.1133472
70. Golan T, Hammel P, Reni M, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(4):317. doi:10.1056/NEJMOA1903387
71. Aschenbrenner DS. Olaparib Approved for Metastatic Pancreatic Cancer. *Am J Nurs.* 2020;120(4):22-23. doi:10.1097/01.NAJ.0000660008.32418.6C
72. Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):DE01. doi:10.7860/JCDR/2016/15837.7460

73. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. Pancreatic Cancer Cells Enhance the Ability of Collagen Internalization during Epithelial–Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2012;7(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0040434
74. Sinha A, Cherba D, Bartlam H, et al. Mesenchymal-like pancreatic cancer cells harbor specific genomic alterations more frequently than their epithelial-like counterparts. *Mol Oncol*. 2014;8(7):1253. doi:10.1016/J.MOLONC.2014.04.007
75. Zheng T, Han W, Wang A, Wang Y. Functional mechanism of hsa-miR-128- 3p in epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via ZEB1 regulation. *PeerJ*. 2022;10. doi:10.7717/PEERJ.12802/SUPP-49
76. PANC-1 - CRL-1469 | ATCC. Accessed March 9, 2024. <https://www.atcc.org/products/crl-1469>
77. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*. 1975;15(5):741-747. doi:10.1002/IJC.2910150505
78. 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
79. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, et al. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*. 2010;39(4):425. doi:10.1097/MPA.0B013E3181C15963
80. Hs 766T - HTB-134 | ATCC. Accessed March 10, 2024. <https://www.atcc.org/products/htb-134>
81. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. Pancreatic Cancer Cells Enhance the Ability of Collagen Internalization during Epithelial–Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2012;7(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0040434
82. Maupin KA, Sinha A, Eugster E, et al. Glycogene Expression Alterations Associated with Pancreatic Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition in Complementary Model Systems. *PLoS One*. 2010;5(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0013002

83. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 1994;58(2):185-191. doi:10.1002/IJC.2910580207
84. Introduction to Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - PT. Accessed March 9, 2024. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
85. Mycoplasma Contamination | ATCC. Accessed March 10, 2024. <https://www.atcc.org/the-science/authentication/mycoplasma-contamination>
86. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111(1):A3.B.1. doi:10.1002/0471142735.IMA03BS111
87. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. Published online March 9, 2011. doi:10.1002/9780470649367
88. Lindström HJG, Friedman R. Inferring time-dependent population growth rates in cell cultures undergoing adaptation. *BMC Bioinformatics*. 2020;21(1):1-13. doi:10.1186/S12859-020-03887-7/TABLES/1
89. Gutiérrez L, Stepien G, Gutiérrez L, et al. Nanotechnology in Drug Discovery and Development. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. 2017;1-8:264-295. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9
90. 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. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(11):1543-1546. doi:10.1080/09553002.2019.1642541
91. Capriotti K, Capriotti JA. Dimethyl Sulfoxide: History, Chemistry, and Clinical Utility in Dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2012;5(9):24-26.
92. Waissi W, Amé JC, Mura C, Noël G, Burckel H. Gemcitabine-Based Chemoradiotherapy Enhanced by a PARP Inhibitor in Pancreatic Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 6825. 2021;22(13):6825. doi:10.3390/IJMS22136825

93. Nonnekens J, van Kranenburg M, Beerens CEMT, et al. Potentiation of Peptide Receptor Radionuclide Therapy by the PARP Inhibitor Olaparib. *Theranostics*. 2016;6(11):1821. doi:10.7150/THNO.15311
94. Bi Y, Verginadis II, Dey S, et al. Radiosensitization by the PARP inhibitor olaparib in BRCA1-proficient and deficient high-grade serous ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2018;150(3):534-544. doi:10.1016/J.YGYNO.2018.07.002
95. 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
96. Spoomans K, Crabbé M, Struelens L, De Saint-Hubert M, Koole M. A Review on Tumor Control Probability (TCP) and Preclinical Dosimetry in Targeted Radionuclide Therapy (TRT). *Pharmaceutics*. 2022;14(10). doi:10.3390/PHARMACEUTICS14102007
97. Subiel A, Ashmore R, Schettino G. Standards and Methodologies for Characterizing Radiobiological Impact of High-Z Nanoparticles. *Theranostics*. 2016;6(10):1651. doi:10.7150/THNO.15019
98. Ugwu DI, Conradie J. Anticancer properties of complexes derived from bidentate ligands. *J Inorg Biochem*. 2023;246:112268. doi:10.1016/J.JINORGBIO.2023.112268
99. 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. doi:10.1667/RADE-22-00040.1
100. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007 2:5. 2007;2(5):1084-1104. doi:10.1038/nprot.2007.77
101. Emam AN, Girgis E, Khalil WKB, Mohamed MB. Toxicity of Plasmonic Nanomaterials and Their Hybrid Nanocomposites. *Advances in Molecular Toxicology*. 2014;8:173-202. doi:10.1016/B978-0-444-63406-1.00005-2
102. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:299. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_26

103. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010 24:4. 2010;24(4):679-686. doi:10.1038/leu.2010.6
104. Garcia-Canton C, Anadón A, Meredith C. γ H2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: Applications for the assessment of the in vitro genotoxicity of cigarette smoke. *Toxicology in Vitro*. 2012;26(7):1075-1086. doi:10.1016/J.TIV.2012.06.006
105. Kuo LJ, Yang LX. γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo (Brooklyn)*. 2008;22(3):305-309. Accessed May 14, 2024. <https://iv.iijournals.org/content/22/3/305>
106. Solovjeva L, Firsanov D, Pleskach N, Svetlova M. Immunofluorescence Analysis of γ -H2AX Foci in Mammalian Fibroblasts at Different Phases of the Cell Cycle. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1644:187-194. doi:10.1007/978-1-4939-7187-9_17
107. Popp HD, Brendel S, Hofmann WK, Fabarius A. Immunofluorescence Microscopy of γ H2AX and 53BP1 for Analyzing the Formation and Repair of DNA Double-strand Breaks. *J Vis Exp*. 2017;2017(129):56617. doi:10.3791/56617
108. DepMap Cell Line Summary. Accessed July 3, 2024. https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000164?tab=overview
109. Su Y, Sai Y, Zhou L, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by TP53 mutation in cancer. *Front Oncol*. 2022;12:1023427. doi:10.3389/FONC.2022.1023427/BIBTEX
110. McCluskey JT, Hamid M, Guo-Parke H, McClenaghan NH, Gomis R, Flatt PR. Development and Functional Characterization of Insulin-releasing Human Pancreatic Beta Cell Lines Produced by Electroporation. *J Biol Chem*. 2011;286(25):21982. doi:10.1074/JBC.M111.226795
111. Wang C, Zhang W, Juan Fu M, Yang A, Huang H, Xie J. Establishment of human pancreatic cancer gemcitabine-resistant cell line with ribonucleotide reductase overexpression. *Oncol Rep*. 2015;33(1):383-390. doi:10.3892/or.2014.3599
112. Miura K, Kimura K, Amano R, et al. Establishment and characterization of new cell lines of anaplastic pancreatic cancer, which is a rare malignancy: OCUP-A1 and OCUP-A2. *BMC Cancer*. 2016;16(1). doi:10.1186/S12885-016-2297-Y

113. Cowley GS, Weir BA, Vazquez F, et al. Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Sci Data*. 2014;1. doi:10.1038/SDATA.2014.35
114. Leibniz Institute DSMZ: Details. Accessed June 15, 2024. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-783>
115. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(5). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A026062
116. 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. doi:10.1667/RADE-22-00040.1
117. Wéra AC, Lobbens A, Stoyanov M, Lucas S, Michiels C. Radiation-induced synthetic lethality: combination of poly(ADP-ribose) polymerase and RAD51 inhibitors to sensitize cells to proton irradiation. *Cell Cycle*. 2019;18(15):1770-1783. doi:10.1080/15384101.2019.1632640
118. Kobayashi D, Oike T, Murata K, et al. Induction of Micronuclei in Cervical Cancer Treated with Radiotherapy. *Journal of Personalized Medicine* 2020, Vol 10, Page 110. 2020;10(3):110. doi:10.3390/JPM10030110
119. Hastak K, Bhutra S, Parry R, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, an effective radiosensitizer in lung and pancreatic cancers. *Oncotarget*. 2017;8(16):26344-26355. doi:10.18632/ONCOTARGET.15464

8. Anexos

Anexo I

RightsLink Printable License

07/06/24, 14:30

MARY ANN LIEBERT, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 07, 2024

This Agreement between Gabriela Campos ("You") and Mary Ann Liebert, Inc. ("Mary Ann Liebert, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Mary Ann Liebert, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number 5802091361287

License date Jun 04, 2024

Licensed Content
Publisher Mary Ann Liebert, Inc.

Licensed Content
Publication Antioxidants & Redox Signaling

Licensed Content Title DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective

Licensed Content
Author Joy N. Kavanagh, Kelly M. Redmond, Giuseppe Schettino, et al

Licensed Content Date Jun 20, 2013

Licensed Content
Volume 18

Licensed Content
Issue 18

Type of Use Dissertation/Thesis

Requestor type	academic
Format	print and electronic
Portion	figures/tables
Number of figures/tables	1
Distribution quantity	10
Title of new work	Radioterapia e Inibidor da PARP: Combinação Terapêutica para o Cancro do Pâncreas
Institution name	Universidade de Coimbra
Expected presentation date	Jul 2024
Portions	Figure 1
Requestor Location	Gabriela Campos Rua coimbra, 3000 Portugal Attn: Gabriela Campos
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

Mary Ann Liebert, Inc. publishers Terms and Conditions

1. Introduction

The publisher for this copyrighted material is Mary Ann Liebert, Inc. publishers. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that

the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

2. Limited License

Publisher hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process and any electronic posting is limited to the period committed to at the time of purchase.

3. Geographic Rights: Scope

Licenses may be exercised anywhere in the world.

4. Jurisdiction:

This agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the state of New York, without giving effect to any principles of conflicts of law. If any provision of this agreement shall be unlawful, void, or for any reason unenforceable, then that provision shall be deemed severable from this agreement and shall not affect the validity and enforceability of any remaining provisions. This is the entire agreement between the parties relating to the subject matter herein and shall not be modified except in writing, signed by both parties.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted

You may not alter or modify the material in any manner without the explicit approval of the Publisher.

6. Reservation of Rights

Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

7. License Contingent on Payment

While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

8. Copyright Notice: Disclaimer

You must include the following copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material: "The publisher for this copyrighted material is Mary Ann Liebert, Inc. publishers."

9. Warranties: None

Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and Payment terms and conditions for this licensing transaction.

10. Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License

This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms

Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

v1.1

Questions? customercare@copyright.com.