

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

ESTÁGIO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

**ESTÁGIO DE NATUREZA PROFISSIONAL- NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA**

AUTOR: MÁRCIA SOFIA POTRA BORRALHO

ORIENTADORES

DOUTORA PAULA CRISTINA DUARTE MENDONÇA – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA
SAÚDE DE LISBOA

DOUTORA MARÍLIA MARIA RODRIGUES DA SILVA – SEA4US

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais
Lisboa, 2024

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

ESTÁGIO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

**ESTÁGIO DE NATUREZA PROFISSIONAL- NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA**

AUTOR: MÁRCIA SOFIA POTRA BORRALHO

ORIENTADORES

DOUTORA PAULA CRISTINA DUARTE MENDONÇA – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA
DA SAÚDE DE LISBOA

DOUTORA MARÍLIA MARIA RODRIGUES DA SILVA – SEA4US

PRESIDENTE DO JÚRI:

DOUTORA EDNA SORAIA RIBEIRO – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE
LISBOA

ARGUENTE:

DOUTOURA MARIA TERESA FRANCHI MENDES – INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2024

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico, é também uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratasse.”

-Marie Curie

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar o presente relatório de estágio e de o divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor. Copyright© 2024 – Márcia Sofia Potra Borralho

Agradecimentos

Numa primeira instância gostaria de agradecer à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, por todos os ensinamentos fornecidos pelos docentes, em especial do mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais que me transmitiram conhecimentos científicos e morais, com o fundamento de ser melhor profissional.

Um obrigado especial à Professora Paula Mendonça que foi o elo de ligação à faculdade e que sempre teve disponível para mim e para esclarecer as minhas dúvidas.

Quero também agradecer à minha orientadora externa, a Doutora Marília Silva que me acompanhou todos os dias desta longa jornada, onde ensinou-me competências além de profissionais, também pessoais, sendo a resiliência, confiança e a capacidade de aceitação uns dos grandes pilares que adquiri ao longo deste ano. Obrigado Marília!

Aos meus colegas, Vicente Esteves, Rosa Abreu, Ana Alinho, Ana Chegão, Beatriz Szwarc, André Bastos, Tomás Barros, Sílvia Lino, Diego Hartmann, Patrícia Sequeira, Pedro Lima, Maria João Cabeleira, Zara Marques, Fernanda Barcelos e Nuno Leitão, agradeço não pelas novas competências que me ensinaram, mas também por toda a fraternidade com a qual me acolheram e fizeram-me sentir em casa.

Obrigado especial também à Sea4Us por confiarem em mim e pela oportunidade para estagiar e de crescer pessoalmente e profissionalmente!

Em segunda instância, quero agradecer à minha mãe que sem ela não tinha sido possível chegar onde cheguei, obrigado pelas asas que me deste para poder voar e percorrer o meu caminho. Um obrigado especial ao meu irmão, que sempre será o meu maior amor, em que a existência dele e a admiração que nutre por mim me faz querer ser melhor todos os dias. Quero também agradecer à minha família por todo apoio, dedicação, por estarem sempre lá quando precisava de desabafar mesmo quando não entendiam a importância daqueles momentos.

Não menos importante, gostaria de agradecer à minha Ana, a Ana Cenourinha, que está comigo e nunca me abandona, nem me deixa desanimar nos momentos mais complicados. Obrigado pela paciência amiga, estarás sempre presente em todas as temporadas.

Por fim, quero agradecer a todos os meus amigos, sem eles não seria a pessoa que sou hoje.

Os meus sinceros obrigado a todos!

Resumo

O cancro é um dos principais responsáveis pelo número de óbitos nos países desenvolvidos, a deteção precoce é imprescindível para aumentar as probabilidades de tratamento e sobrevida. As células cancerígenas têm um elevado potencial metabólico e de sobrevida, afetando por vezes os tecidos e órgãos nas proximidades, à medida que a doença progride ocorrem mutações que originam uma heterogeneidade tumoral, sendo necessário haver várias abordagens terapêuticas para auxiliar todos os doentes. Até ao momento, a quimioterapia continua a ser o modelo standard. Os fármacos quimioterapêuticos são agentes citotóxicos, causando efeitos colaterais, sendo o Paclitaxel (PTX) o anticancerígeno mais utilizado para tumores sólidos.

O PTX provoca degeneração axonal, manifestando-se em forma de dor neuropática, conhecida Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia (CIPN), manifestando-se com sintomas sensoriais como sensibilidade em relação à pressão, dor, temperatura, toque e sensação de formigueiro nos pés e mãos.

A CIPN afeta quase 70% dos indivíduos ao fim de um mês de quimioterapia e perdura em 1/3 após 6 meses. Infelizmente, ainda não existe um tratamento nem um coadjuvante para a quimioterapia que seja neuroprotetor e impeça que este processo se inicie.

Assim, a proposta científica do presente estágio tem por base a comparação de compostos S4UR1 e S4UR2 à *baseline* terapêutica do PTX com o intuito de verificar a possibilidade destas moléculas serem coadjuvantes para a quimioterapia, com o objetivo de mitigar e/ou prevenir o desenvolvimento da CIPN.

Recorrendo a uma abordagem técnica multidisciplinar de cultura de células, com células cancerígenas (MCF-7) e fibroblastos dérmicos humanos adultos e técnicas de biologia molecular (western-blotting), é possível a validação da adequação dos compostos, assegurando a eficácia do tratamento anticancerígeno basal.

Através da análise dos resultados de citotoxicidade é possível comprovar que os compostos não afetam a *baseline* terapêutica do PTX e que podem ser co-adjuvantes para a quimioterapia, no entanto será necessário aumentar a complexidade do estudo e avaliar a citotoxicidade dos compostos em co-culturas.

Para uma maior validação através das técnicas de Western-blotting, será necessário aumentar o N do nosso estudo e fazer a análise completa dos canais de sódio

dependentes da voltagem (Nav) que estão associados ao processo de dor neuropática, tal como o Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9.

Palavras-chave: Neuropatia periférica induzida por quimioterapia (CIPN), Paclitaxel, S4UR1, S4UR2.

Abstract

Cancer is one of the main causes of death in developed countries and early detection is essential to increase the chances of treatment and survival. Cancer cells have a high metabolic and survival potential, sometimes affecting nearby tissues and organs. As the disease progresses, mutations occur that give rise to tumor heterogeneity, requiring various therapeutic approaches to help all patients. To date, chemotherapy remains the standard model. Chemotherapeutic drugs are cytotoxic agents, causing side effects, with Paclitaxel being the most widely used anticancer drug for solid tumors.

PTX causes axonal degeneration, manifesting itself in the form of neuropathic pain, known as Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN), manifesting itself with sensory symptoms such as sensitivity to pressure, pain, temperature, touch and tingling sensations in the feet and hands.

CIPN affects almost 70% of individuals after one month of chemotherapy and persists in 1/3 after 6 months. Unfortunately, there is still no treatment or adjunct to chemotherapy that is neuroprotective and prevents this process from starting.

Thus, the scientific proposal of this internship is based on the formulation of compounds S4UR1 and S4UR2 as coadjuvants for chemotherapy and with the aim of mitigating and preventing the development of CIPN.

Using a multidisciplinary technical approach of cell culture with cancer cells (MCF-7) and adult human dermal fibroblasts and molecular biology techniques (western-blotting), it is possible to validate the suitability of the compounds, ensuring the efficacy of the baseline anticancer treatment.

By analyzing the cytotoxicity results, it is possible to prove that the compounds do not affect the therapeutic baseline of PTX and that they can be co-adjuvants for chemotherapy. However, it will be necessary to increase the complexity of the study and evaluate the cytotoxicity of the compounds in cocultures.

For further validation using molecular biology techniques, it will be necessary to increase the N of our study and carry out a complete analysis of the voltage-dependent sodium channels (Nav) that are associated with the neuropathic pain process, such as Nav 1.7, Nav 1.8 and Nav 1.9.

Key-words: Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN), Paclitaxel, S4UR1, S4UR2.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vi
Abstract	viii
Índice de figuras.....	xii
Índice de tabelas.....	xiv
Índice de equações.....	xv
Lista de abreviaturas.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1 Objetivos	2
2. Enquadramento teórico.....	3
2.1 Mecanismos de ação dos Taxanos, (Paclitaxel, PTX)	4
2.2 CIPN	5
2.3 Proposta de solução.....	8
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Condições gerais para a cultura de células	9
3.1.1 Lançar a cultura celular	9
3.1.2 Contagem de células.....	10
3.1.3 Manutenção e subcultura celular.....	11
3.2 Ensaios de citotoxicidade com combinações de fármacos	13
3.2.1 Plaquear células para ensaio	13
3.2.2 Preparação de compostos.....	13
3.2.3 Tratamento.....	14
3.3 Western-blotting	16
3.3.1 Material biológico proveniente de ratos modelo CIPN.....	17
3.3.2 Preparação da lise de tecidos (DRG)	18
3.3.3 Quantificação de proteínas.....	18

3.3.4 Eletroforese em <i>SDS-PAGE</i>	19
3.3.4.1 Preparação de amostras.....	20
3.3.4.2 Separação de proteínas por peso molecular.....	20
3.3.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana	21
3.3.6 Incubação de anticorpos	21
3.3.7 Detecção por quimiluminescência	22
3.3.8 Quantificação das membranas.....	23
3.3.9 Desligar anticorpos.....	23
3.3.10 Otimização.....	23
3.4 Análise Estatística.....	24
4. Resultados.....	24
4.1 Otimização da linha celular MCF-7 como modelo celular em estudos de citotoxicidade	25
4.2 Resultados de citotoxicidade em linha celular de cancro da mama com os fármacos PTX, S4UR1 e S4UR2.....	25
4.3 Dose-resposta e sinergias linha celular de cancro da mama com os fármacos PTX, S4UR1 e S4UR2	31
4.4 Resultados de citotoxicidade em células saudáveis em comparação com células cancerígenas.....	32
4.5 Caracterização de canais nociceptivos em animais CIPN através da técnica de Western-Blotting.....	35
5. Discussão	36
6. Conclusão.....	41
7. Conclusions	43
8. Proposta de Projeto de Investigação.....	44
9 Referências bibliográficas.....	47
10 Anexos.....	51

Índice de figuras

Figura 1- Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.....	2
Figura 2.1- Representação esquemática de vários processos inflamatórios envolvidos no surgimento da CIPN ^[11]	6
Figura 2.2 - Ilustração da transmissão do sinal elétrico do SNP com o SNC (adaptado 24)	8
Figura 3.1 Centrifuga A- PRF 12.	10
Figura 3.2 Câmara de Neubauer. São conta 1 Câmara de Neubauer. São contadas as células dos quadrados A, B, C e D, de seguida faz-se a média das mesmas.....	10
Figura 3.3 - Células MCF-7 (A) e fibroblastos (B) com 70-80% de confluência.....	11
Figura 3.4 - Protocolo de passagem de células (adaptado de 23).....	12
Figura 3.5– Da esquerda para a direita, placa 1/2 com células tratadas só com PTX, placa 2/2, terapia combinada de PTX coadjuvado com a molécula S4UR1 ou S4UR2.	13
Figura 3.6 - Leitor de absorvências a 490 nm.....	16
Figura 4- Sobreposição do gel de acrilamida sobre a membrana para a realização da transferência.....	21
Figura 5- Monoterapia dose resposta para PTX (A), S4UR1 (B), S4UR2 (C)	26
Figura 6- Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7), em concentrações fixas de 12,5 µM (A), 50 µM (B) e 200 µM (C), variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM.....	27
Figura 7-Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7, em concentrações fixas de 12,5 µM (A), 50 µM (B) e 100 µM (C), variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM.....	28
Figura 8 -Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 62,5 nM (A), 500 nM (B) e 2000 62,5 nM (C), variando em todas a molécula S4UR1 em concentrações [0-200] µM	29
Figura 9- Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 62,5 nM (A), 200 nM (B) e 2000 62,5 nM (C), variando em todas a molécula S4UR2 em concentrações [0-200] µM	31

Figura 10- Gráficos de dose resposta das moléculas S4UR1 (A) e S4UR2 (C). Gráficos de pontuação de sinergia das moléculas S4UR1 (B) e S4UR2 (D), realizados no software SynergyFinder, no modelo Loewe.....	32
Figura 11- Ensaios de citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos (aHDF) e células cancerígenas (MCF-7). Terapias com S4UR1 (A) e Terapias com S4UR2 (B).	34
Figura 12- Estudo da expressão de canais iónicos (Nav 1.7) em DRGs (A). Quantificação da expressão em função do loading control (β -actina) (B)	35
Figura 13 - Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7), em concentrações fixas de 6,25 μ M , 25 μ M e 100 μ M, variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM	51
Figura 13 - Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7), em concentrações fixas de 6,25 μ M, 25 μ M e 200 μ M, variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM	52
Figura 14 -Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 125 nM, 250 nM e 1000 nM, variando em todas a molécula S4UR1 em concentrações [0- 200 μ M]	53
Figura 15- Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 125 nM, 500 nM e 1000 nM , variando em todas a molécula S4UR2 em concentrações [0- 200 μ M]	54
Figura 16- Gráficos de pontuação de sinergia da molécula S4UR1, realizados no software SynergyFinder, no modelo ZIP (A), HSA (B) e Bliss (C).....	55
Figura 17 - Gráficos de pontuação de sinergia da molécula S4UR2, realizados no software SynergyFinder, no modelo ZIP (A), HSA (B) e Bliss (C).....	55

Índice de tabelas

Tabela 1- Concentração dos compostos stocks	13
Tabela 2- Monoterapia de Paclitaxel, diluição seriadas	14
Tabela 3- Terapia combinada.....	15
Tabela 4- Instruções para preparação dos Standards.....	19
Tabela 5- Descrição da receita para os géis de Staking (4%) e de separação de proteínas (10%), respetivamente	20
Tabela 6- Receita para a preparação de Running Buffer	20
Tabela 7- Receita para preparação do stock de lavagem de membranas.....	22
Tabela 8- Tabelas de anticorpos e respetivas diluições	22
Tabela 9- Atividades realizadas durante o estágio e respetivos objetivos.....	24

Índice de equações

Equação 1- Equação para determinar a viabilidade celular.....	11
Equação 2- Estimativa de células vivas, calculada através do fator de diluição (2), da média de células vivas (M) e do volume onde foram resuspendidas (V)	11
Equação 3- Equação para diluição de soluções	14

Lista de abreviaturas

APS: *Ammonium Persulfate*, Persulfato de amónio

BSA: *Bovine Serum Albumin*, Albumina de soro bovino

CIPN: *Chemotherapy-induced peripheral neuripathy*, Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia

DCT: Docetaxel

DMEM: *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*

DMSO: *Dimethyl Sulfoxide*

DPBS: *Dulbecco´s phosphate- buffered saline*

DRG: *Dorsal root ganglion*, Gânglio da raiz dorsal

FBS: *Fetal Bovine Serum*, Soro fetal bovino

Na⁺: Ião Sódio

PBS: *Protein Sample Buffer*, Tampão de amostra de proteína

PTX: Paclitaxel

PVDF: *Polyvinylidene Fluoride*

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

SPCAL: Sociedade Portuguesa de Ciências e Animais de Laboratório

TRPV1: *Transient Receptor Potencial Vanilloid 1*

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

WB: Western- blotting

1. Introdução

A Sea4Us é uma empresa de biotecnologia onde o principal foco é a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos inspirados em compostos de origem marinha, com o intuito de solucionar condições clínicas sem tratamento adequado e que condicionam a qualidade de vida dos pacientes, respondendo a necessidades clínicas, principalmente na área da dor. Devido ao interesse de investigadores pela diversidade marinha portuguesa, a Sea4Us foi fundada em 2013, sendo Sagres o local de recolha de amostras e o Laboratório de Lisboa da NOVA Medical School onde ocorre o desenvolvimento pré-clínico ^[1].

No ano de 2023 a Sea4Us foi certificada em Sistemas de Investigação, Desenvolvimento e Inovação pela eiC, de acordo com a norma NP4457:2007.

O presente estágio decorreu no Laboratório de Fisiologia e de Microbiologia da Nova Medical School, havendo assim uma colaboração direta com esta. Este encontra-se inserido num projeto científico com elevada importância para a saúde dos pacientes submetidos a quimioterapia. A pertinência deste estágio é ganhar competências e aptidões na área laboratorial e profissional, desenvolvendo *skills* nas mesmas, aprofundando assim os conteúdos lecionados no 1º ano curricular do mestrado em Tecnologias-Clinico Laboratoriais.

Este estágio tem o primordial foco a saúde e bem-estar, estando direcionado à saúde e melhor qualidade de vida, podemos assim inserir no 3º Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS), “Saúde de Qualidade”, garantindo assim o acesso à saúde de qualidade para todos, em todas as idades.

Todos os processos realizados têm sempre especial atenção à sustentabilidade e a preservação dos ecossistemas, podendo assim inserir também no 14º objetivo “Proteger a vida marinha”, sendo imprescindível conservar e usar de forma sustentável os oceanos, mares e recursos marinhos ^[2], visto que estes são a principal fonte de matéria-prima da Sea4Us (Figura 1).



Figura 1- Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.

1.1 Objetivos

O presente estágio tem como foco o contacto com a área laboratorial em contexto profissional, adquirindo assim novas competências e *skills* laboratoriais incidindo no estudo de uma terapia de prevenção à Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia (CIPN). Além dos desenvolvimentos técnicos e experimentais na execução do estágio, existe um output chave na trajetória educacional e profissional da mestrand. Os objetivos técnicos e de competências pessoais do estágio são:

1. Ganhar competências em metodologias laboratoriais e desenvolvimento de boas práticas para o bom funcionamento de um laboratório de investigação científica, num ambiente empresarial.
2. Identificar e aplicar temas científicos para o bom funcionamento do estágio curricular.
3. Otimizar e aplicar de técnicas de cultura celular, nomeadamente da linha celular MCF-7.
4. Caracterizar a adequação dos compostos S4UR1; SAUR2 como coadjuvantes ao tratamento com fármacos quimioterapêuticos clássicos (paclitaxel), através de ensaios de citotoxicidade.
5. Aplicar e avaliar a técnica Western-Blotting, comparando diferenças no perfil molecular de células da *Dorsal Root Ganglia* (DRG) de ratos saudáveis e de ratos modelos de doença (CIPN).

6. Incorporar o plano de tarefas deste estágio profissional representa um dos *milestones* do projeto em que está inserido, culminando assim na escrita de uma patente.
7. Obter conhecimento técnico e científico para a escrita do relatório final de estágio e para o desenvolvimento profissional e académico.

2. Enquadramento teórico

O cancro é o um dos principais responsáveis pelo número de óbitos nos países desenvolvidos e, conseqüentemente, por um aumento de números de mortes entre pessoas com menos de 65 anos na Europa, sendo assim um importante problema de saúde pública ^[3]. Apesar da pandemia do vírus Sars-CoV-2, em 2019 (COVID-19) e haver atrasos no diagnóstico e tratamento de várias patologias, incluindo o cancro, os dados mais reais da incidência deste no presente vão estar desfasados cerca de 2 a 3 anos, devido às conseqüências secundárias da pandemia ^[4]. No entanto, em 2021, estima-se que houve 19,3 milhões de novos casos de cancro e 10 milhões de mortes, sendo o mais comum, o cancro da mama, com 523 mil casos na Europa ^[3] e 2,3 milhões no mundo, continuando a aumentar substancialmente ^[5]. Apesar da pandemia e a falta de dados concretos, a taxa de mortalidade continuou a diminuir de 2019 para 2020 (em 1,5%). Esta estatística reflete os progressos e os avanços no tratamento desta patologia, sendo evidente um rápido declínio da mortalidade (cerca de 2% por ano de 2016 a 2020) ^[4].

A deteção precoce do cancro aumenta as probabilidades de tratamento e sobrevivência, sendo assim fulcral reconhecer e diagnosticar esta patologia com a maior brevidade possível ^[6].

Em tumores mais agressivos ocorre uma divisão celular descontrolada que pode comprometer a fisiologia de células saudáveis nas proximidades dos órgãos e tecidos afetados. As células cancerígenas são capazes de resistir a vários estímulos, como baixos suprimentos de oxigénio e nutrientes, adquirindo um elevado potencial metabólico e de sobrevivência. À medida que a doença progride ocorrem múltiplas mutações e anomalias genéticas que se acumulam e levam a um aumento de heterogeneidade tumoral, sendo necessário o desenvolvimento de várias abordagens terapêuticas com o intuito de chegar a todos os doentes ^[7].

No domínio da farmacoterapia, foram alcançados progressos significativos em relação ao cancro, conduzindo a um aumento do número de sobreviventes ^[8]. Nas últimas

décadas, tem havido um desenvolvimento de combinações de novas terapias para o tratamento de vários tipos de cancro, ou terapias suplementares à quimioterapia, desde imunoterapia, terapia alvo e medicina personalizada, no entanto apesar das evidências crescentes que a abordagem direcionada pode ser o futuro da medicina a nível do cancro, a quimioterapia continua a ser o modelo standard ^[9].

Os fármacos quimioterapêuticos são referidos principalmente como agentes citotóxicos, causando efeitos colaterais, devido à sua elevada toxicidade, ocorrendo danos graves, ou falência de múltiplos órgãos o que leva a um elevado stress psicológico e fisiológico dos doentes sob medicação quimioterapêutica^[9].

2.1 Mecanismos de ação dos Taxanos, (Paclitaxel, PTX)

O Paclitaxel (PTX) e o Docetaxel (DCT) são os principais membros da família dos taxanos ^[10], sendo o PTX o fármaco anticancerígeno mais utilizado. PTX, mais conhecido como Taxol, é o fármaco quimioterapêutico utilizado como primeira linha no tratamento de uma variedade de tumores sólidos, como cancro da mama, do ovário, do pulmão, entre outros, infelizmente a sua citotoxicidade pode limitar a terapêutica, visto que a administração de PTX danifica os nervos periféricos, sensoriais e motores, interferindo na sua função normal, exercendo o seu efeito citotóxico através da ligação heterodímero β - tubulina, estabilizando os microtúbulos, levando à interrupção da mitose e do ciclo celular, culminando na apoptose celular (morte programada das células) ^{[10],[11]}.

Nas células em proliferação, tais como as células tumorais, a polimerização da tubulina induzida pelo Paclitaxel inibe a formação do fuso mitótico, durante a mitose, originando a paragem celular na fase G2/M do ciclo celular. No caso das células pós-mitóticas, como os neurónios, não há uma divisão celular, assim é expectável que a polimerização da tubulina induzida pelo PTX interfira no transporte axonal, causando a neuropatia periférica ^[12].

Esta degeneração axonal distal leva a uma perda de fibras nervosas, manifestando-se na forma de dor neuropática, e é conhecida como Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia (CIPN – *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy*), uma condição debilitante que afeta muitos pacientes submetidos a tratamentos contra o cancro. Nestes pacientes é frequentemente necessário ajustar as doses administradas ou até suspender o tratamento, o que está frequentemente associado a falhas do tratamento, ou remissões ^[10].

2.2 CIPN

O diagnóstico e tratamento do cancro são episódios inquietantes para o paciente e para a sua família, devido a fatores psicológicos e físicos, quer em relação a efeitos adversos do cancro ou resultado de intervenções terapêuticas ^[13].

A CIPN é caracterizada por uma lesão nervosa e degeneração de axónios, que progride da região distal para a proximal, das extremidades (mãos e pés), para os braços e pernas. Esta é adquirida por a exposição a agentes tóxicos, tais como os compostos antineoplásicos, sendo esta uma premissa dolorosa da consequência da primeira linha de tratamento de cancro, a quimioterapia com paclitaxel ^[11]. Os principais sintomas da CIPN são sensoriais, tais como a sensação reduzida e muita sensibilidade em relação à pressão, dor, temperatura, toque, sensação de alfinetes e agulhas, com distribuição simétrica de “meias e luvas” ^[11], ^[14].

Uma das adversidades da CIPN é esta patologia se desenvolve após o início do tratamento quimioterapêutico e os sintomas progridem ou pioram com a continuação do tratamento, ou seja, são dose-dependentes ^[14]. Após a conclusão do tratamento anticancerígeno 68,1% dos indivíduos desenvolvem CIPN dentro de um mês, 60,0% continua a sofrer ao fim de três meses e perdura em aproximadamente um terço dos pacientes após 6 meses ^[14], ^[15], ^[16]. Por vezes o desenvolvimento da CIPN aguda promove a interrupção ou a diminuição da dose da quimioterapia, assim pode comprometer a eficácia do tratamento e a sobrevivência do paciente, ^[15], ^[17] logo é de elevada importância o desenvolvimento de um fármaco que possa prevenir e combater a CIPN, promovendo uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Os mecanismos neuronais relativos à CIPN ainda não são totalmente compreendidos, apesar de haver evidências que indicam que o paclitaxel afeta as funções dos canais iónicos, sinalização de neurotransmissores, fatores de transcrição, mediadores pró e anti-inflamatórios, mitocôndrias, etc ^[18].

Para o desenvolvimento de CIPN é necessário a ativação e inflamação de vários fatores e agentes. No sistema nervoso central (SNC) há um aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na medula espinal, devido a uma interferência genética existe um aumento da interleucina-6 (IL-6), que tem um papel fundamental na manutenção e desenvolvimento da dor neuropática ^[11].

O recetor potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1- *Transient Receptor Potential Vanilloid1*) é um canal catiónico sensível a vários fatores, tal como o calor, pH ácido ou mediadores inflamatórios. Este é encontrado no sistema somatossensorial em

neurónios nociceptores, que faz com que o sistema nervoso interprete sinais de dor no corpo [19]. Há uma ativação da proteína PKC que está relacionada à função aumentada do TRPV1, aumentando assim a nocicepção e a expressão do TRPV1/ PKC na medula espinal e de gânglio da raiz dorsal (DRG - *Dorsal Root Ganglia*) de animais tratados com PTX, revelando o papel desta via na dor neuropática do animal [11] (Figura 2.1).

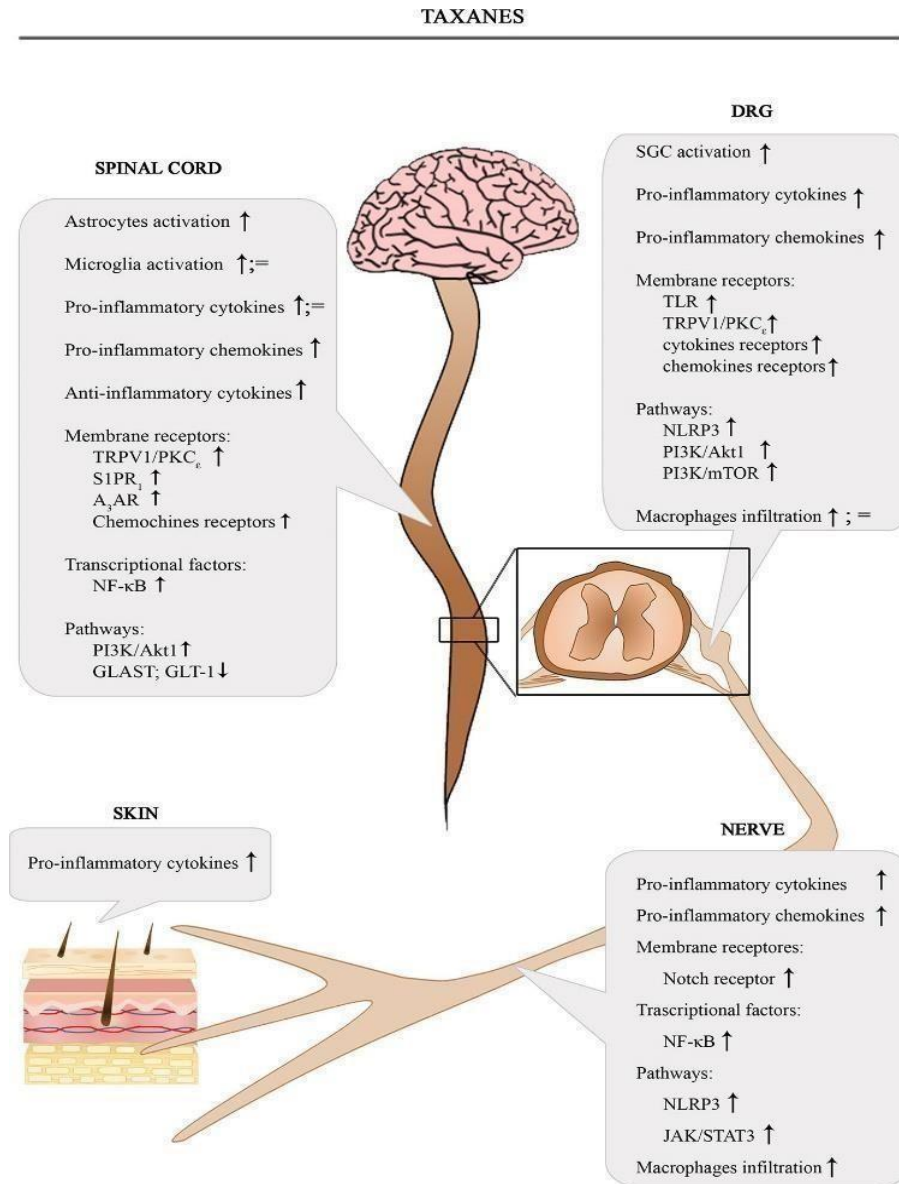


Figura 2.1- Representação esquemática de vários processos inflamatórios envolvidos no surgimento da CIPN [11].

A indução de taxanos, como o PTX origina patologias ao nível dos canais iónicos (*Channelopathies*), estas resultam de distúrbios genéticos e mutações em genes que codificam os canais iónicos, adquirindo anomalias funcionais. Estes canais são

proteínas localizadas nas membranas celulares, através das quais controlam o fluxo de iões. Assim, estas mutações nos canais de sódio levam à degeneração axonal e hiperexcitabilidade nos DRG, que se manifesta sob a forma de dor neuropática [20],[21]. Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) que estão associados a este processo de dor neuropática são o Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 (codificados pelos genes *SCN9A*, *SCN10A* e *SCN11A*, respetivamente).

A necessidade da procura de tratamento para a CIPN é desafiadora devido ainda à falta de compreensão da sua fisiopatologia. Já foram testados vários agentes farmacológicos e não farmacológicos em ensaios clínicos para prevenção e tratamento, apesar de alguns se mostrarem promissores é necessário efetuar mais estudos.

A duloxetina é, atualmente, o único medicamento aprovado para tratar os sintomas da CIPN, sendo um reposicionamento de antidepressivos, aumentando os níveis de serotonina e noradrenalina no cérebro, podendo ter efeitos positivos no controle do humor e na redução da perceção da dor, ainda assim, devido ao facto de ser um antidepressivo, a duloxetina ainda não é a solução mais viável para tratar a CIPN e não é preventiva da mesma. Além disso, a terapia não farmacológica, tal como a acupuntura e fisioterapia tem sido eficaz em alguns casos clínicos [14]. Também é utilizada na prática clínica a indução de opiáceos para atenuar a dor nos casos de CIPN, atuando no SNC, estando associados a habituação e dependência.

Existem opções de contenção dos sintomas e gestão da dor, mas não existe um tratamento nem um coadjuvante para a quimioterapia que seja neuroprotetor e impeça que este processo se inicie. Na prática clínica o procedimento standard é analisar os melhores métodos tópicos e não tópicos para ajudar a mitigar os sintomas, ao não haver nenhum fármaco de prevenção e combate à doença, é este um dos grandes objetivos, tal como a formulação de um fármaco que não atue ao nível do SNC.

O uso de drogas antineoplásicas, afetam diferentes mecanismos e estruturas do sistema nervoso periférico (SNP), os axónios, ou os DRG^[11], que consiste em células sensoriais primárias, ou neurónios de DRG, que estão situados ao longo da coluna vertebral, desempenham um papel vital na condução de estímulos dolorosos projetando a transmissão sensorial da pele para o SNC, conectando assim o SNP com o SNC (Figura 2.2), visto que os neurónios de DRG são neurónios de primeira ordem na via da dor [22],[23].

Assim, o principal alvo terapêutico será ao nível dos DRG, no sistema nervoso periférico, não causando habituação.

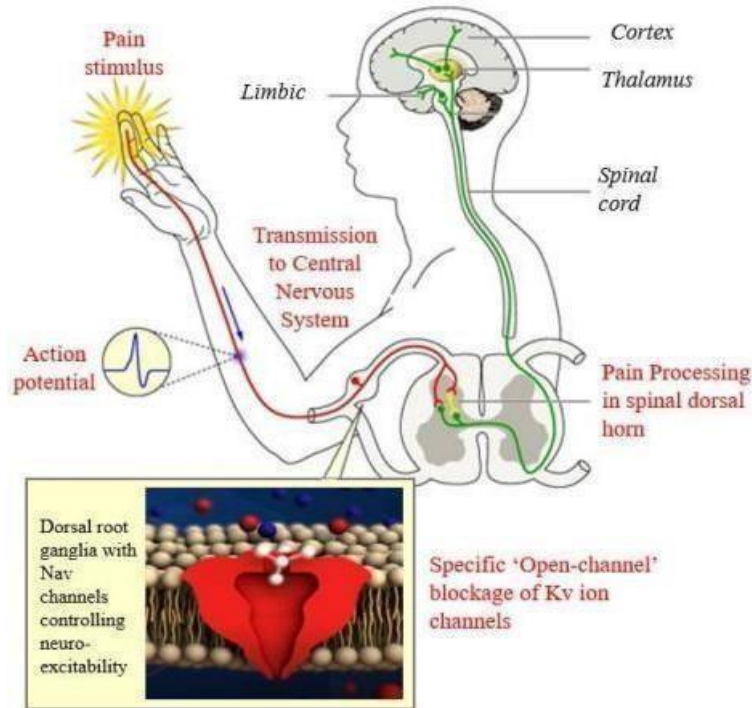


Figura 2.2 - Ilustração da transmissão do sinal elétrico do SNP com o SNC (adaptado 24).

2.3 Proposta de solução

Na empresa foi identificada a molécula “S4U” numa esponja marinha, sendo de origem natural, sintetizada por um organismo marinho. Inspirado na química desta molécula foram encontradas numa base de dados química outras duas moléculas de estrutura idêntica, que já estão aprovadas como fármacos anticancerígenos no mercado. Dados prévios da Sea4Us demonstraram que estas duas moléculas (doravante designadas como “S4UR1” e “S4UR2”) têm potencial analgésico, ao atuar ao nível dos canais de sódio hiper-estimados de modelos animais CIPN. Existe também um pressuposto científico em como atuam ao nível da neuroinflamação e que têm potencial ao nível da dor causada pela CIPN, sendo esta também intrinsecamente dependente do processo inflamatório.

Em estudos anteriores na Sea4Us foi também possível ver o efeito *in vivo* ao nível da dor em modelos de animais CIPN. Assim, ao administrar estes compostos como co-adjuvantes com PTX em ratinhos CIPN foi possível observar uma gestão da dor crónica associada à CIPN, havendo um efeito analgésico, atuando ao nível do sistema nervoso periférico, não causando habituação. Atualmente, na empresa é pretendido ir mais

longe para confirmar se além de uma diminuição da dor, existe efeito na neurodegeneração e na mitigação instalação da CIPN.

Assim, a proposta científica onde o presente estágio se insere tem por base a formulação dos compostos S4UR1 e S4UR2 como co-adjuvantes para quimioterapia, com o objetivo de mitigar/prevenir o desenvolvimento da CIPN, efeito secundário da terapia citotóxica. Deste modo, este estágio está inserido numa das linhas científicas em curso: a validação da adequação destes compostos enquanto co-adjuvantes para a quimioterapia de PTX, assegurando a eficácia do tratamento anticancerígeno basal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Condições gerais para a cultura de células

A linha celular imortalizada de cancro da mama utilizada nos ensaios é a MCF-7 (ATCC® HTB-22™) e foi adquirida em parceria com a Fundação Champalimaud. Para todos os ensaios e manutenção de células em cultura foi usado o meio de crescimento basal DMEM (DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Thermo Fisher Scientific) com suplementos para o crescimento das mesmas, tal como 10% de FBS (FBS - *Fetal Bovine Serum*) (Thermo Fisher Scientific), 1% de Pen/Strep (Pen/Strep – *penicilin/streptomycin mixture*) (Thermo Fisher Scientific) e 10 ug/ml de insulina.^[25]

Como linha controlo foram usados fibroblastos dérmicos humanos adultos (P10858 HDFa da Innoprot, Derio, Espanha). As células foram mantidas em cultura e plaqueadas para ensaio em DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de Pen/Strep.

3.1.1 Lançar a cultura celular

Para iniciar a cultura de células, é necessário descongelar um vial de criogenização com a linha celular imortalizada necessária, aquecendo o vial com agitação suave, num banho com água a 37°C. Quando os cristais de gelo estiverem descongelados, coloca-se o conteúdo do vial para um falcon de centrifugação com 5 ml de meio e leva-se à centrifuga a 1300 rpm e 1000g durante 5 minutos (Figura 3.1). Após a centrifugação remover o sobrenadante e resuspender, cuidadosamente, as células com 1 ml de meio fresco. Perfazer com 3 a 4 ml e fazer a contagem de células.



Figura 3.1 Centrifuga A- PRF 12.

3.1.2 Contagem de células

Para plaquear à densidade pretendida, é necessário recorrer ao corante azul tripano (*Trypan blue*) (Células vivas excluem o *Trypan Blue*, enquanto células mortas com membranas danificadas absorvem-no, ficando azuis), com uma diluição de 1:2, colocando num eppendorf 10 ul de meio celular e 10 ul de azul tripano, para realizar a contagem de células numa câmara de Neubauer. (Figura 3.2)

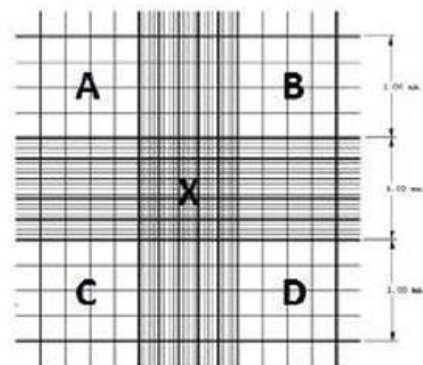


Figura 3.2 Câmara de Neubauer. São conta 1 Câmara de Neubauer. São contadas as células dos quadrados A, B, C e D, de seguida faz-se a média das mesmas.

Após a contagem de células na câmara de Neubauer, é possível calcular a viabilidade (equação 1) das mesmas através da média de células vivas e mortas e fazer uma estimativa da contagem de células vivas (equação 2).

$$V = \frac{\text{Média células vivas}}{\text{Soma das médias de células vivas e mortas}} \times 100 \%$$

Equação 1- Equação para determinar a viabilidade celular.

$$\text{Células vivas} = 2 \times M \times V \times 10000$$

Equação 2- Estimativa de células vivas, calculada através do fator de diluição (2), da média de células vivas (M) e do volume onde foram resuspendidas (V).

3.1.3 Manutenção e subcultura celular

Dependente da necessidade de crescimento e expansão das células foram utilizados frascos de cultura T-25 ou T-75 a uma densidade celular de 2×10^4 células/cm². As células são mantidas numa atmosfera húmida, nas condições *standard* a 37°C com 5% de CO₂. O meio deve ser trocado a cada 2 ou 3 dias até atingirem 70-80% (Figura 3.3) de confluência, sendo realizada uma nova passagem.

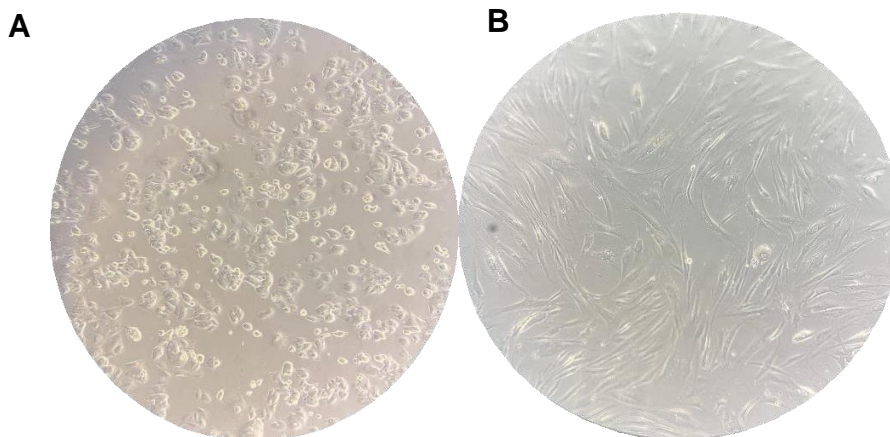


Figura 3.3 - Células MCF-7 (A) e fibroblastos (B) com 70-80% de confluência, ampliação de 10x, em ambas as linhas celulares.

3.1.4 Criopreservação celular

Para observar o crescimento celular é utilizado um microscópio invertido com contraste de fase, sendo facilmente identificável a percentagem de confluência das células MCF-7, pois com o aumento da expansão há uma tendência na formação de nichos e aglomerados de células. Quando é atingida a confluência pretendida, realiza-se a passagem para um novo T-Flask, através da tripsinização. Assim, retiramos o meio

exausto do T-Flask e adicionamos cerca de 2 ml de DPBS (DPBS - *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) (Thermo) para realizar a primeira lavagem e retirar as células mortas. O DPBS é uma solução salina isotónica, mantendo a integridade celular durante o processo de lavagem. De seguida, as células são tratadas com 2 – 4 ml de tripsina 0,05% durante 5 minutos na incubadora, com o intuito de levantar as células aderidas. Após a suspensão das células, as células MCF-7 são centrifugadas a 1300 rpm e os fibroblastos a 1000 rpm, durante 5 minutos. Por fim, o pellet é ressuspendido em meio de cultura fresco e as células plaqueadas à densidade pretendida para manter a cultura de células (Figura 3.4) [23].

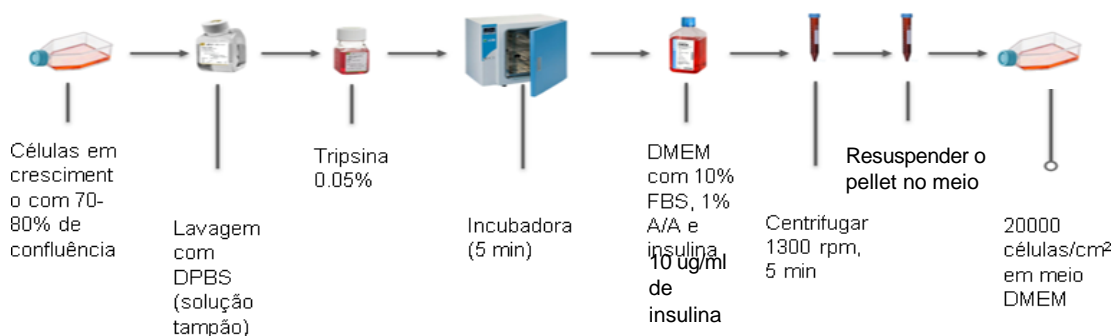


Figura 3.4 - Protocolo de passagem de células (adaptado de 23).

Durante a manutenção da cultura de células, um pré-requisito é a necessidade de produzir um banco de células através da criopreservação, de modo a garantir a perpetuação da linha celular mantendo a sua qualidade, sem haver a redução da taxa de proliferação, alterações genéticas e alteração dos padrões de expressão. Para tal, é feito um banco de preservação a longo prazo (*master bank*) em passagens mais baixas, e um banco de preservação a curto prazo (*working bank*) com passagens mais altas.

Cerca de $1,5 \times 10^6$ células/ml são congeladas no seu meio de cultura adicionando 10% de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), este é utilizado não só como solvente para facilitar a administração de compostos não solúveis em água, na cultura celular, mas também como crioprotetor para evitar a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e descongelamento [26]. As células devem ser congeladas em ambiente controlado, (*Mr.Frosty™ Freezing Container, ThermoFisher*) com uma taxa de congelamento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ e armazenadas durante 24 horas numa arca -80° , após este

período é aconselhado transferir os tubos criogénicos para uma arca de -150° , ou se possível para a criopreservação em azoto, para garantir uma viabilidade a longo termo.

3.2 Ensaios de citotoxicidade com combinações de fármacos

3.2.1 Plaquear células para ensaio

Após a contagem do número de células vivas calculamos o volume necessário para a cultura em placas de 96 poços com uma densidade de $7,5 \times 10^3$ células por poço em 100µl de DMEM, ficando a aderir *overnight*. Ao fim de 24 horas realizamos os tratamentos com os fármacos, em terapia combinada vs. monoterapia, com o intuito de ver a atividade do PTX isolado ou quando em coadjuvância com as moléculas S4UR1 ou S4UR2 (Figura3.5).

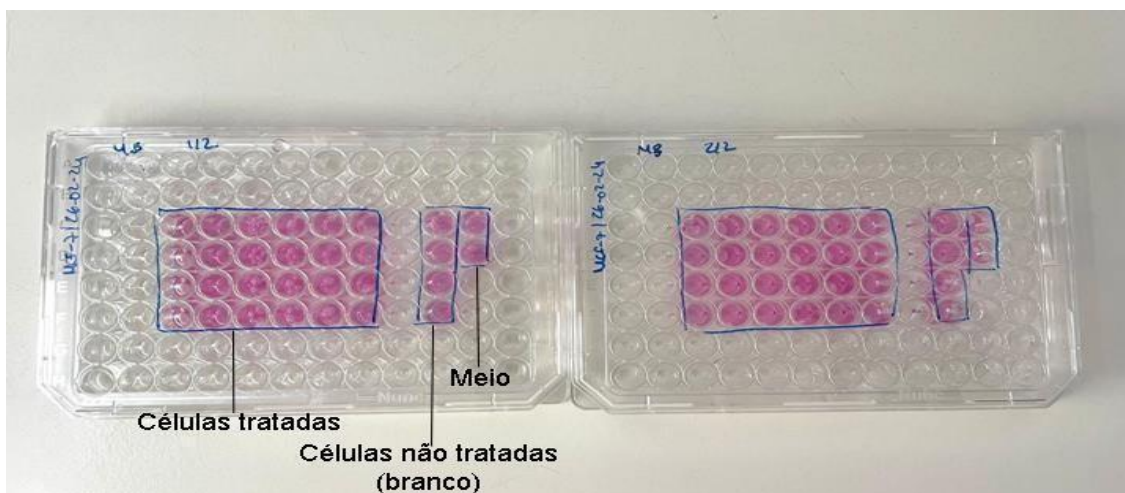


Figura 3.5– Da esquerda para a direita, placa 1/2 com células tratadas só com PTX, placa 2/2, terapia combinada de PTX coadjuvado com a molécula S4UR1 ou S4UR2.

3.2.2 Preparação de compostos

Para preparar os compostos em concentrações *stock* (Tabela 1) é necessário diluí-los num solvente orgânico, como por exemplo o DMSO. De modo a preservar a integridade das moléculas, estes *stocks* deverão ser armazenados pelo período máximo de um mês na arca a -20°C e até seis meses na arca a -80°C , protegidos da luz.

Compostos	mM	µM	nM
Paclitaxel	5	5×10^3	5×10^6
S4UR1	10	1×10^4	1×10^7
S4UR2	50	5×10^4	5×10^7

Tabela 1- Concentração dos compostos stocks.

Para estabelecer a concentração final pretendida (concentrações de trabalho) para os nossos ensaios é necessário recorrer à equação 3, de forma a calcular o volume necessário dos compostos.

$$c_i \times v_i = c_f \times v_f$$

Equação 3- Equação para diluição de soluções.

3.2.3 Tratamento

Após a preparação dos compostos, efetua-se a preparação das placas de tratamentos que posteriormente serão administrados nas células deixadas em crescimento durante 24 horas.

O ensaio é realizado em placas de 96 poços com 4 repetições para cada concentração de paclitaxel, este está diluído numa proporção de 1:2, obtendo assim várias concentrações num ensaio seriado (2000nM; 1000nM; 500nM; 250nM; 125nM; 62,5 nM) (Tabela 2). É colocado paclitaxel numa concentração de 4000 nM no primeiro poço, a partir deste fez-se a diluição para os restantes, onde só continham 110 ul de meio DMEM, ressuspendendo sempre, cuidadosamente.

As diluições seriadas efetuaram-se com uma pipeta multicanal.

	110 µl	110 µl	110 µl	110 µl	110 µl	110 µl
120 µl [4000 nM] PTX	DMEM [2000 nM] PTX	DMEM [1000 nM] PTX	DMEM [500 nM] PTX	DMEM [250 nM] PTX	DMEM [125 nM] PTX	DMEM [62,5 nM] PTX
120 µl [4000 nM] PTX	DMEM [2000 nM] PTX	DMEM [1000 nM] PTX	DMEM [500 nM] PTX	DMEM [250 nM] PTX	DMEM [125 nM] PTX	DMEM [62,5 nM] PTX
120 µl [4000 nM] PTX	DMEM [2000 nM] PTX	DMEM [1000 nM] PTX	DMEM [500 nM] PTX	DMEM [250 nM] PTX	DMEM [125 nM] PTX	DMEM [62,5 nM] PTX
120 µl [4000 nM] PTX	DMEM [2000 nM] PTX	DMEM [1000 nM] PTX	DMEM [500 nM] PTX	DMEM [250 nM] PTX	DMEM [125 nM] PTX	DMEM [62,5 nM] PTX

Tabela 2- Monoterapia de Paclitaxel, diluição seriadas.

No entanto, a concentração dos compostos S4UR1 e S4UR2 é fixa, visto que o objetivo é ver a resposta da variação do paclitaxel em determinada concentração dos compostos, como coadjuvantes ao tratamento quimioterapêutico. Foram testadas

várias concentrações das presentes moléculas. (200 µM; 100 µM; 50 µM; 25 µM; 12,5 µM; 6,25 µM) (Tabela 3). O ensaio foi realizado em placas de cultura celular de 96 poços com 2 repetições para cada concentração testada.

Com o propósito de haver um acerto de concentrações é necessário começar com o dobro da concentração inicial para garantir que as moléculas transferidas de poço para poço é o mesmo, para não haver uma diluição e garantir a concentração pretendida do início ao fim do ensaio.

120 µl [4000 nM] PTX	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2
120 µl [4000 nM] PTX	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2	[25 µM] S4UR1 ou S4UR2
120 µl [4000 nM] PTX	[100 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2
120 µl [4000 nM] PTX	[100 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2	[50 µM] S4UR1 ou S4UR2

Tabela 3-Terapia combinada.

Após a preparação das placas de compostos pipeta-se os tratamentos para a placa com as células aderidas ao fim 24 horas, para isso é necessário retirar o meio exausto através de uma bomba a vácuo e com uma seringa de diâmetro 0,45x25 mm, para não perturbar as células aderidas. De seguida pipeta-se 100 µl da placa dos compostos para a placa de células.

Após 48 horas de incubação realiza-se a leitura das absorvâncias no leitor (SPECROstar Nano-601) (Figura 3.6) no comprimento de onda 490 nm. Para realizar esta leitura, prepara-se uma solução de 60% de MTS com 40% de meio, colocando 20 µl em cada poço que será lido.



Figura 3.6 - Leitor de absorvências a 490 nm.

3.3 Western-blotting

Com o intuito de confirmar a expressão proteica e o comportamento de proteínas expressas em canais iónicos de sódio (Na^+), tal como Nav.1.7 é utilizada a técnica de Western-blotting, sendo esta uma técnica frequentemente utilizada em biologia molecular, sendo a mais comum para detetar proteínas e fornecer dados quantitativos, em relação à proteína alvo em amostras biológicas [27].

A presente técnica tem múltiplas etapas, onde é possível ocorrer algumas variações e erros, sendo necessário um processo de otimização de procedimentos para garantir reprodutibilidade.

As etapas iniciam com a preparação das amostras, onde é necessária a extração das proteínas e a sua quantificação, de seguida existe a separação das proteínas no gel *SDS-PAGE* e a transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Power Blotter Select Transfer Stacks. Nitrocellulose, regular Size) ou fluoreto de polivilideno (PVDF- *polyvinylidene fluoride*) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Power Blotter Select Transfer Stacks. PVDF, regular Size), de seguida há o bloqueio de proteínas não específicas na membrana. Este bloqueio ocorre com leite em pó 5%, com o intuito de reduzir as ligações inespecíficas entre as proteínas e os anticorpos utilizados na última etapa, sendo a incubação com os anticorpos primários e secundários. O último passo será a deteção do sinal que reflete a ligação antigénio/anticorpo e análise densitométrica de bandas de proteínas de interesse usando o software ImageJ-Image Processing and Analysis in Java (Figura 3.7)

[28].

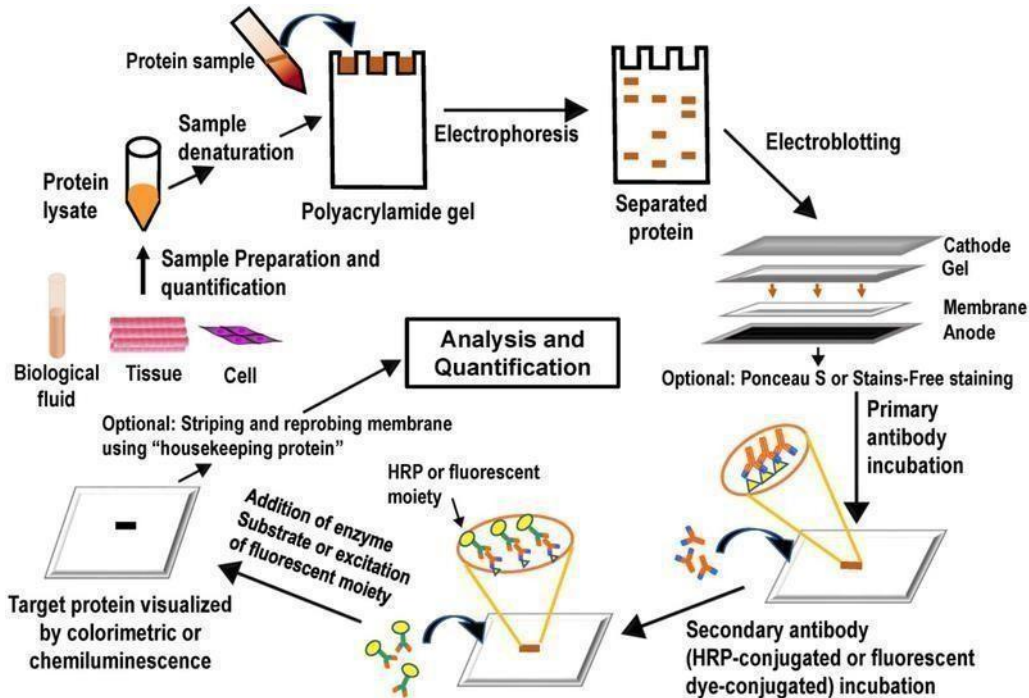


Figura 3.7-Representação esquemática da técnica de biologia molecular, Western-Blotting^[28].

3.3.1 Material biológico proveniente de ratos modelo CIPN

Para realizar a técnica de biologia molecular, Western-Blotting, com o intuito de comparar a diferença do perfil molecular e a expressão dos canais iónicos associados à dor crónica, foi necessário induzir o modelo *in vivo* de dor neuropática induzida pela quimioterapia (Modelo CIPN). O presente modelo foi induzido ao longo de seis semanas, após um período de habituação dos animais aos operadores e condições experimentais.

Todos os aspetos da experiência estiveram em conformidade com a Diretiva 2010/63/EU sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos.

O modelo foi dividido em seis grupos de ratos *Wistar* fêmea, jovem adultos, onde existia o grupo veículo (Bk) e os grupos que foram administrados os compostos isolados, PTX (grupo R), S4UR1 (grupo B), S4UR2 (grupo G), ou os compostos combinados, PTX+ S4UR1 (grupo RB), PTX+ S4UR2 (grupo RG).

Consoante a solubilidade dos compostos, as administrações foram intravenosas, intraperitoneal ou intravenosa e intraperitoneal, as doses também variaram conforme a toxicidade de cada composto e de uma vasta pesquisa na literatura existente. Sendo administrado 10 mg/kg de PTX, 3 mg/kg de S4UR1 e 1 mg/kg de S4UR2. Os tratamentos

foram administrados semanalmente e preparados com o veículo mistura KES (1:1:8 Kolliphor:Ethanol:Saline).

Os ratos foram monitorizados diariamente para averiguar o peso, bem-estar e saúde geral. A monitorização da dor mecânica ocorreu em regime semanal e da dor térmica semanalmente.

Todo o modelo foi realizado por operadores certificados com o curso de experimentação animal, aprovado pela Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório (SPCAL). No presente relatório foram apenas avaliados os DRGs provenientes destes modelos animais e realizadas técnicas *post mortem*, tendo havido um acompanhamento exclusivamente teórico da indução destes modelos.

3.3.2 Preparação da lise de tecidos (DRG)

Dos modelos animais referidos em 3.3.1, foram isoladas amostras de neurónios DRG (L4-L6), com perfil de doença (CIPN), tratados ou não tratados com S4UR1 ou S4UR2 e células de animais saudáveis. Às amostras biológicas foi adicionado 150 µl do tampão de lise RIPA (RIPA - *radio-immunoprecipitation buffer*), (Tris-HCl 50 mM ph 7.4, EDTA 1 Mm, NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%, *Sodium Deoxycholate* (DOC) a 1%, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) a 0.1%), com inibidores de proteases. Para extrair proteínas com eficácia é necessário homogeneizar bem a amostra recorrendo a um pilão automático para romper eficazmente a membrana celular e libertar o conteúdo intracelular. As amostras foram submetidas a dois ciclos de sonificação por pulsos (1 segundo *on*, 45 milissegundos *off*, durante 30 segundos, com 25 a 27% de intensidade.) Posteriormente foram centrifugadas a 10000G, durante 10 minutos, a 4°C para retirar o sobrenadante (onde estão as proteínas) para um novo *ependorf* de 1,5 ml e o *pellet* descartado ^[30].

3.3.3 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas foi utilizado um ensaio de *Bradford*, com recurso ao Kit BIO-RAD quick start Bovine Serum (BSA) Standert Set. Para preparar o *standard* é necessário recorrer às instruções do fornecedor (Tabela 4). A amostra foi diluída 1:200 em água destilada. Para fazer a leitura das amostras numa placa de 96 poços é necessário colocar numa diluição de 1:1, 100 µl de amostra e 100 µl de reagente de trabalho, foi utilizado o BIO-RAD *Start Bradford* 1x Dye Reagente.

Eppendorf	Volume de Padrão (μ l)	Padrão Stock	Volume de diluente (μ l)	Concentração final de proteína (μ l/ml)
1	10	2mg/ml	790	25
2	5	2mg/ml	495	20
3	5	1,5mg/ml	495	15
4	5	1mg/ml	495	10
5	5	0,5mg/ml	495	5
6	5	0,25mg/ml	495	2,5
7	5	0,125mg/ml	495	1,25
B (branco)	-	-	500	0

Tabela 4- Instruções para preparação dos Standards.

A placa foi colocada a incubar entre 10-30 minutos. A leitura de absorvância foi realizada no leitor SPECTROstar Nano-601, no comprimento de onda de 595 nm. Para quantificar a proteína na amostra é necessário recorrer à regressão linear da curva de calibração, $y = mx + b$, sendo o **m** o declive da curva e o **b** a ordenada na origem, obtida pela leitura de absorvância dos padrões [23].

3.3.4 Eletroforese em SDS-PAGE

Para ocorrer a separação das proteínas por peso molecular, é necessário haver uma preparação prévia dos géis de acrilamida, dos quais são preparados dois ou quatro por ensaio, o gel de *Stacking* (4%) e o gel de separação de proteínas (7,5%), com quantidades necessárias para duas corridas (Tabela 5).

Após a preparação dos géis, foram utilizados os BIO-RAD Mini PROTEAN® 3 System Glass Plates que foram colocados no suporte para molde do gel.

	Stacking Gel (4%)	Resolving Gel (10%)
dd H ₂ O	3,6 mL	5,8 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	1,5 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	-	3,0 mL
10% SDS	60,0 μ L	120,0 μ L
30% Acrilamida	792,0 μ L	4,0 mL
10% APS	40,0 μ L	80,0 μ L
1% TEMED	8,0 μ L	8,0 μ L

Tabela 5-Descrição da receita para os géis de Staking (4%) e de separação de proteínas (10%), respetivamente.

O APS é o agente polimerizante e o TEMED acelera essa reação, assim são adicionados no final da preparação de cada gel.

O gel de separação é colocado no suporte do molde de vidro e é adicionado isopropanol, visto ter menor densidade, com o intuito de alinhar o gel e prevenir a formação de bolhas. Após a polimerização do gel (30-45 minutos) é retirado o isopropanol com o auxílio de papel de filtro e adicionado o gel de *stacking*. Adiciona-se o pente com o molde para 10 poços e aguarda-se até polimerizar.

3.3.4.1 Preparação de amostras

Devido à quantificação de proteínas (3.3.3), é possível carregar os poços do gel com amostra proteica diluída em água destilada até o volume final de 15 μ l e adicionar 5 μ l de PBS (*PBS- Protein Sample Buffer*), (250 mM Tris.HCL pH 6.8, 40% *Glycerol*, *Bromophenol blue*, 10% β -*Mercaptoethanol*, 8% SDS e perfazer com água destilada até 10 mL de volume), em cada amostra. Para facilitar na desnaturação das proteínas devido à ação do calor, levamos a incubar a 95°C no banho seco por 10 minutos.

3.3.4.2 Separação de proteínas por peso molecular

Para identificação posterior das proteínas, carrega-se o primeiro poço com o marcador de peso molecular (15 μ l) e os restantes com 20 μ l das amostras preparadas previamente (3.3.4.1). A eletroforese corre a 120 mV, 400mA por 1:20h, em *Running buffer* (Tabela 6).

10 x Tris Glycine Buffer	→	Running Buffer
30,2 g Tris Base		100 mL 10x Tris Glycine Buffer
144 g Glycine		10 ml 10% SDS
Água destilada até 1L		Água destilada até 1L

Tabela 6- Receita para a preparação de Running Buffer

Após a eletroforese retira-se o gel do molde, com o auxílio de uma espátula, garantido sempre que o gel está hidratado com a solução tampão, Running Buffer.

3.3.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana

Para ocorrer as transferências das proteínas para as membranas, foram otimizados dois tipos de membrana, tais como a de PVDF e de Nitrocelulose.

Após preparar a membrana coloca-se na base da cassette (Power Blotter, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) e sobrepõem-se o gel, usa-se o rolo para retirar as bolhas de ar (Figura 4). É imprescindível colocar o gel alinhado com a membrana para garantir uma boa transferência. Gentilmente, colocamos o papel de filtro em cima do gel(sandwich), fecha-se a cassette e inserimos no Power Blotter. A transferência é realizada através dos procedimentos standard fornecidos pelo fabricante.

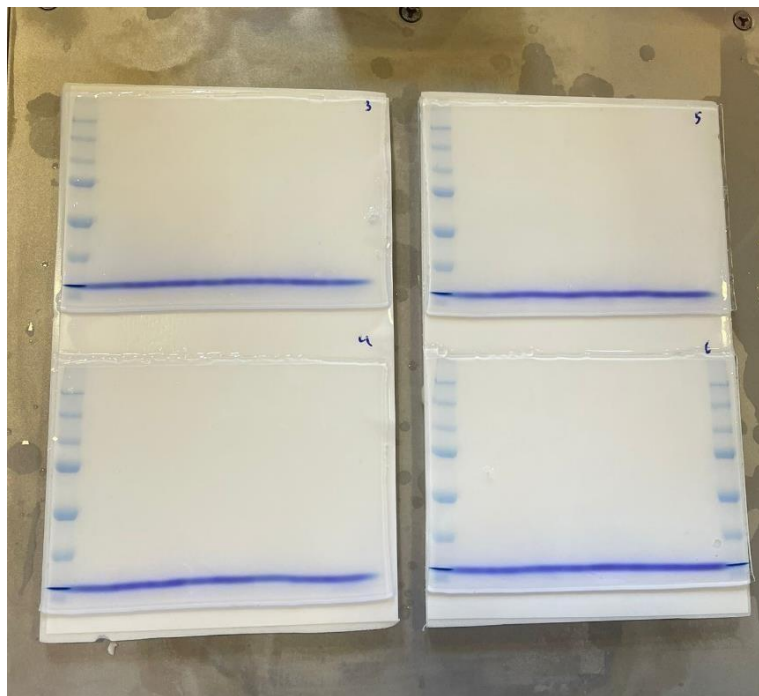


Figura 4- Sobreposição do gel de acrilamida sobre a membrana para a realização da transferência.

3.3.6 Incubação de anticorpos

Após a transferência, a membrana é enxaguada com TBS-T, tal como na tabela 7, e coloca-se a bloquear, em agitação, com leite magro em pó 5% em TBS à temperatura ambiente, no mínimo por 30 minutos.

10x TBS	→	TBS-Tween
160g NaCl		50 mL 20x TBS
48,4g Tris Base		1 mL 10% Tween 20
pH 7,6		Adicionar água destilada até 1 L
Adicionar água destilada até 1 L		-

Tabela 7- Receita para preparação do stock de lavagem de membranas.

Em seguida ao bloqueio, adiciona-se o anticorpo primário anti-Nav 1.7 (NeuroMab clone N68/6) overnight, a 4°C, em agitação, garantindo a exposição do anticorpo a toda a superfície da membrana. Após cerca de 18 horas de incubação as membranas são novamente lavadas com TBS-T (1X) 3 vezes por 10 minutos, sempre em agitação constante. Posteriormente, é incubado a anticorpo secundário Goat Anti-mouse IgG 1:5000, em leite 5%, (Tabela 8) durante 1 hora e 15 minutos. Por fim, fazemos 4 lavagens em TBS-T de 10 minutos cada.

Anticorpos primários	Diluição
Kv 1.2	1:1000
Kv 1.3	
Nav 1.7(Alomone)	1:1000
Nav 1.7 (Neuromad)	1:500
βactina	1:5000
Anticorpos secundários	Diluição
Goat Anti-rabbit	1:5000
Goat Anti-mouse	

Tabela 8- Tabelas de anticorpos e respetivas diluições.

3.3.7 Deteção por quimiluminescência

Depois da incubação das membranas, foram reveladas no equipamento Chemidoc Molecular Imager com recurso ao BIO-RAD, Clarity™ Western ECL Substrate numa diluição de 1:1 de volumes iguais de solução de Luminol e solução de Peroxide. Foi capturado o sinal de quimiluminescência, com a exposição apropriada, foi também retirada uma fotografia colorimétrica para detetar o marcador.

3.3.8 Quantificação das membranas

A quantificação do sinal é realizada através da deteção deste que reflete a ligação antigénio/ anticorpo por densitometria, sempre relativa ao sinal de *loading control*, β -actina. Esta é uma proteína estrutural que está expressa de forma constante em células e tecidos, sendo utilizada como referencial para a quantificação de proteínas, usando o software ImageJ-Image Processing and Analysis in Java.

3.3.9 Desligar anticorpos

Quando necessário, as membranas podem voltar a ser incubadas com diferentes anticorpos, assim é necessário usar uma solução de *stripping buffer*, durante 45 minutos, em agitação, à temperatura ambiente, seguidas de 4 lavagens em TBS-T (Tabela 7), após a lavagem voltamos a repetir o passo 3.3.6 antes de serem submetidas a uma nova incubação com os anticorpos necessários.

3.3.10 Otimização

Apesar do protocolo estabelecido e descrito para o modelo CIPN, foram otimizadas várias etapas no procedimento de western-Blot, num modelo existente *in house*. Assim, as competências laboratoriais na técnica de Western-blot foram desenvolvidas ao longo de seis meses, seguindo o planeamento da equipa, visto o presente estágio decorrer em contexto empresarial.

As otimizações iniciaram-se com a necessidade e compreensão de quais as proteínas em estudo e o seu peso molecular correspondente, adaptando assim a concentração do gel de acrilamida. A percentagem do gel varia conforme o peso molecular, sendo concentrações mais elevadas para proteínas de baixo peso molecular e concentrações mais baixas, para proteínas de elevado peso molecular.

O protocolo de transferência do gel para as membranas foi adequado, conforme a proteína estudada e o seu respetivo anticorpo, sendo otimizado o tipo de membrana, PVDF para os KV 1.2 e Kv 1.3 (dados não apresentados) ou Nitrocellulose para o Nav 1.7. Seguindo as recomendações do fabricante, o tempo de transferência e a amperagem também foram adaptadas a cada ensaio.

O procedimento de bloqueio de uma membrana é uma etapa crucial para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos e aumentar a especificidade do sinal, assim este método também necessitou de um longo processo de otimização. Foram bloqueadas membranas com BSA e leite magro em pó, a 5%.

3.4 Análise Estatística

Os resultados seguintes foram obtidos através da análise de diferentes softwares como Microsoft Excel (Microsoft Office 2013 Professional Plus®), GraphPad Prism 6.01 (Window, GraphPad Software, San Diego California USA) e Image Lab Software 5.2.1

Os resultados foram apresentados com a média e respetivo erro padrão (média \pm erro padrão).

Usamos o teste t-student para comparar a monoterapia PTX, S4UR1 e R2 com as terapias combinadas.

Por fim, foram realizados testes estatísticos two-way ANOVA para verificar o impacto de variáveis independentes sobre a variável dependente.

4. Resultados

Anteriormente à apresentação dos resultados, é necessário expor o plano de atividades realizadas ao longo dos meses de duração do estágio de natureza profissional, indicando os respetivos objetivos.

Atividade	Objetivo
Pesquisa bibliográfica e estudo da dor neuropática.	Compreender a condição CIPN e mecanismos de dor neuropática.
Otimização de cultura celular.	Ganhar competências laboratoriais.
Ensaio de citotoxicidade.	Caracterizar a adequação de compostos (S4UR1 e S4UR2) como co-adjuvantes da CIPN.
Otimização da técnica de Western-blotting em várias amostras.	Identificar a expressão dos canais iónicos tradicionalmente relacionados com a dor.
Estudo da expressão dos canais iónicos por WB.	Comparar a diferença no perfil molecular de DRG em ratos saudáveis e ratos CIPN tratados com os fármacos.
Análise e interpretação de resultados científicos.	Avaliar a implementação dos compostos combinados.
Análise estatística	Ganhar skills com softwares de análise de dados e estatística, tal como o ImageJ, o Excel e o GraphPad

Tabela 9- Atividades realizadas durante o estágio e respetivos objetivos.

4.1 Otimização da linha celular MCF-7 como modelo celular em estudos de citotoxicidade

O início do estágio teve como principal atividade a otimização da cultura de células MCF-7. Foram realizados vários ensaios *in vitro* para testar a densidade de células por poço e a melhor metodologia para a leitura de absorvâncias, dentro do desenho experimental em estudo.

Após uma extensa análise da literatura, foram testadas duas densidades celulares, (5×10^3 e $7,5 \times 10^3$ células por poço, para otimização das condições ótimas desta linha celular num ensaio de citotoxicidade^[31] de 72h (24h de incubação, seguidas de 48h de tratamento com fármacos). Deste modo, foi possível verificar que ao plaquear as células com uma densidade de $7,5 \times 10^3$, (cerca de 50000 células por poço) ao fim das 24 horas de recuperação após a passagem, as células entraram na fase estacionária numa confluência de cerca 70%, permitindo uma resposta mais reprodutível e menos variável aos tratamentos com fármacos (dados não mostrados).

Para a leitura das absorvâncias ao fim das 48h de tratamento, foi otimizada a adição do MTS: retirando o meio celular e adicionando meio com MTS; ou colocando diretamente o MTS ao meio de cultura das células em teste. Deste modo, foi possível verificar que existe menos variação dos resultados (leituras de absorvâncias) ao colocar diretamente o MTS aos poços, provavelmente devido a uma menor perturbação da camada bidimensional de células.

Ambos os ensaios de otimização foram validados com tratamentos com os fármacos em estudo (PTX, S4UR1, S4UR2), confirmando os métodos que oferecem maior reprodutibilidade (dados não mostrados).

4.2 Resultados de citotoxicidade em linha celular de cancro da mama com os fármacos PTX, S4UR1 e S4UR2

Após realizada a otimização em vários ensaios com o intuito de otimizar o material e aprimorar a técnica necessária para as diluições seriadas, iniciaram-se os ensaios com as terapias combinadas, avaliando o efeito de ambos os compostos co-adjuvados com PTX, para avaliar a sua toxicidade, através da viabilidade celular.

Anteriormente, foi estudado pela Sea4Us que ambas as moléculas quando co-administradas com PTX, desenvolvem um efeito protetor, prevenindo o desenvolvimento da dor associada à CIPN. Assim, os resultados obtidos foram desenvolvidos na linha de cancro da mama, MCF-7 e em paralelo com fibroblastos, células saudáveis de controlo.

A citotoxicidade foi avaliada após 48 horas de tratamento com PTX (n=13) (representado a vermelho), S4UR1 (representado a verde) ou SAUR2 em monoterapia (representado a azul) (Figura 5) ou em terapias combinadas de PTX com S4UR1 (n=2/ n=3) (Figura 6) e PTX com S4UR2 (n=2/ n=3) (Figura 7). A investigação foi desenvolvida em diferentes concentrações de PTX em monoterapia [0-2000 nM], ou combinado com as moléculas numa concentração de [0-200 µM].

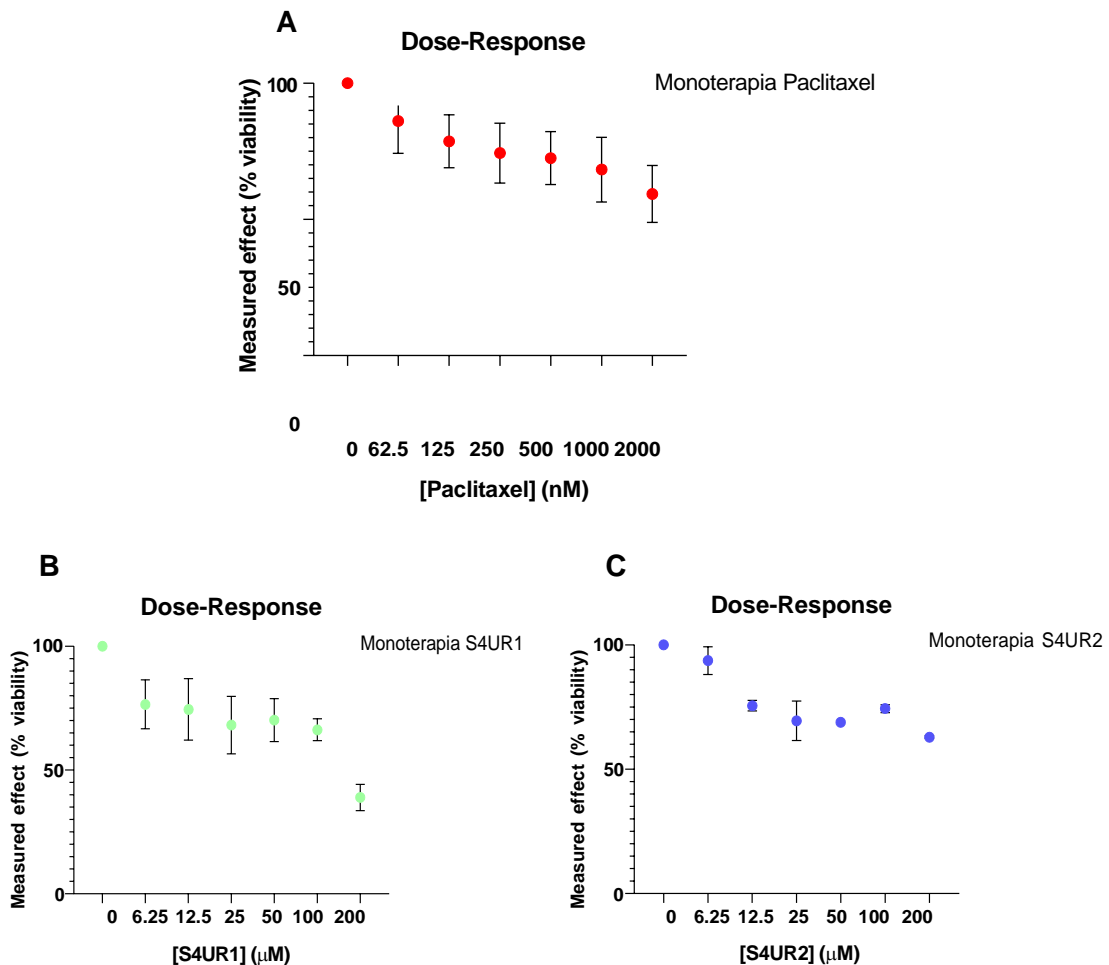


Figura 5- Resultados de citotoxicidade em linha celular de cancro da mama (monoterapia dose resposta para PTX (A) N=17, S4UR1 (B) N=2, S4UR2 (C) N=3). Foi realizada a media dos ensaios em cada concentração e realizado o desvio padrão.

Foram desenvolvidos vários ensaios de citotoxicidade com concentrações crescentes (6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM; 100 µM; 200 µM), com duas ou três repetições por concentração, n=2 ou n=3.

Nos ensaios in vitro da terapia combinada de PTX com S4UR1 (Figura 6) (todos os resultados em anexo) foram testadas várias concentrações. Onde cada ensaio contemplava a monoterapia em PTX (vermelho), S4UR1 (verde) e as combinadas (S4UR1 + PTX – azul claro). Os gráficos apresentados são de 3 concentrações, uma baixa (A), média (B) e elevada (C) para ver o comportamento dos fármacos.

Na molécula S4UR1 é perceptível ao olhar para os gráficos de forma geral que é necessário elevadas concentrações para ser possível ver um efeito aditivo. No entanto, é sempre possível constatar que a viabilidade celular mantém-se muito semelhante na monoterapia e nas terapias combinadas, revelando assim o comportamento das células semelhante na presença ou ausência do PTX.

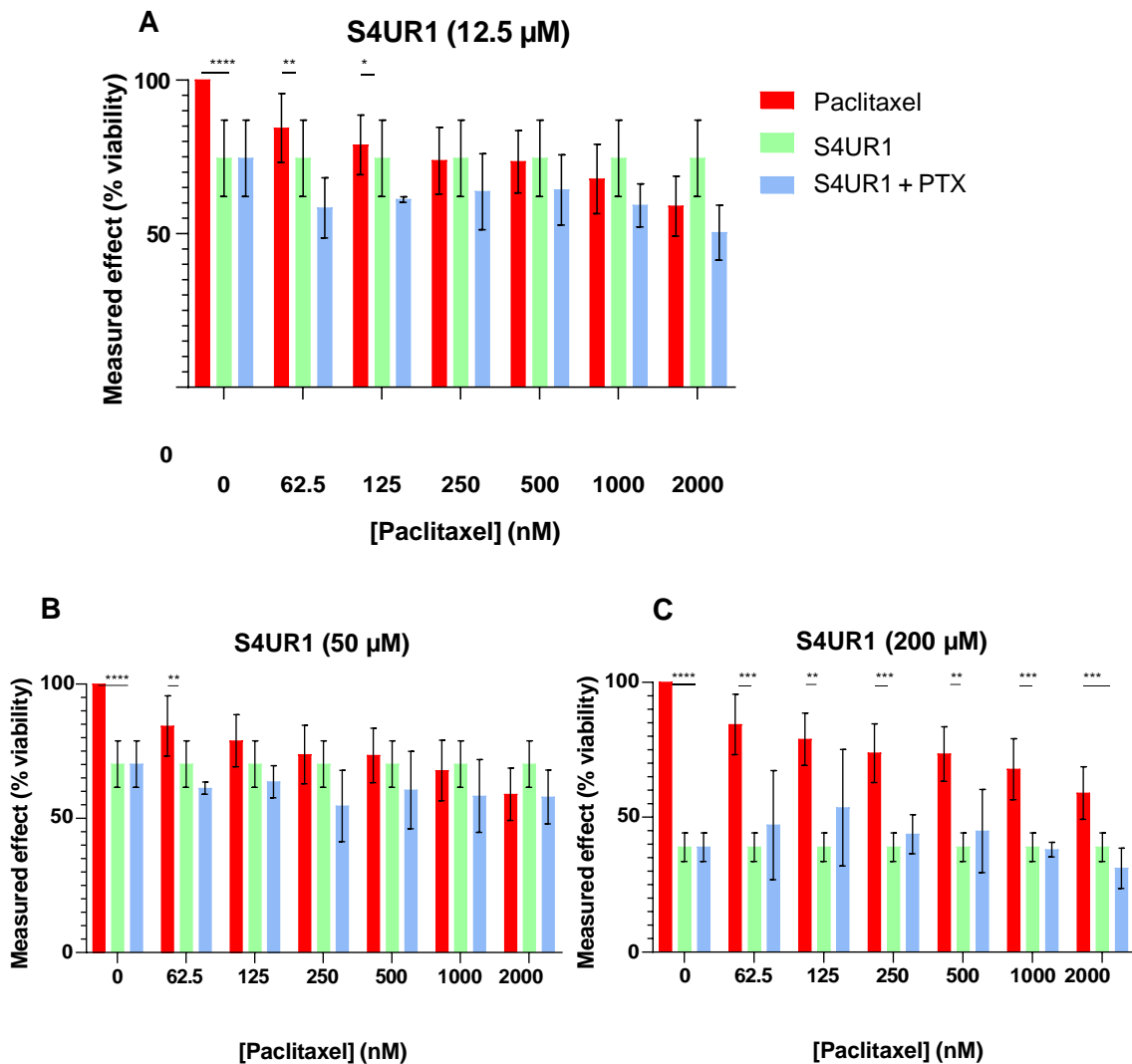


Figura 6- Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7), em concentrações fixas de 12,5 μM (A), 50 μM (B) e 200 μM (C), variando em todas o

PTX em concentrações [0-2000] nM.

Nos ensaios in vitro de terapias combinadas de PTX com S4UR2 (todos os resultados em anexo), foram realizados nas mesmas condições da molécula anterior, contemplando sempre nos ensaios a monoterapia dos dois fármacos (Paclitaxel - vermelho), (S4UR2 - azul) e a combinação dos dois juntos (S4UR2 + PTX - violeta).

As concentrações apresentadas são de 12,5 μ M (A), 50 μ M (B) e 100 μ M (C).

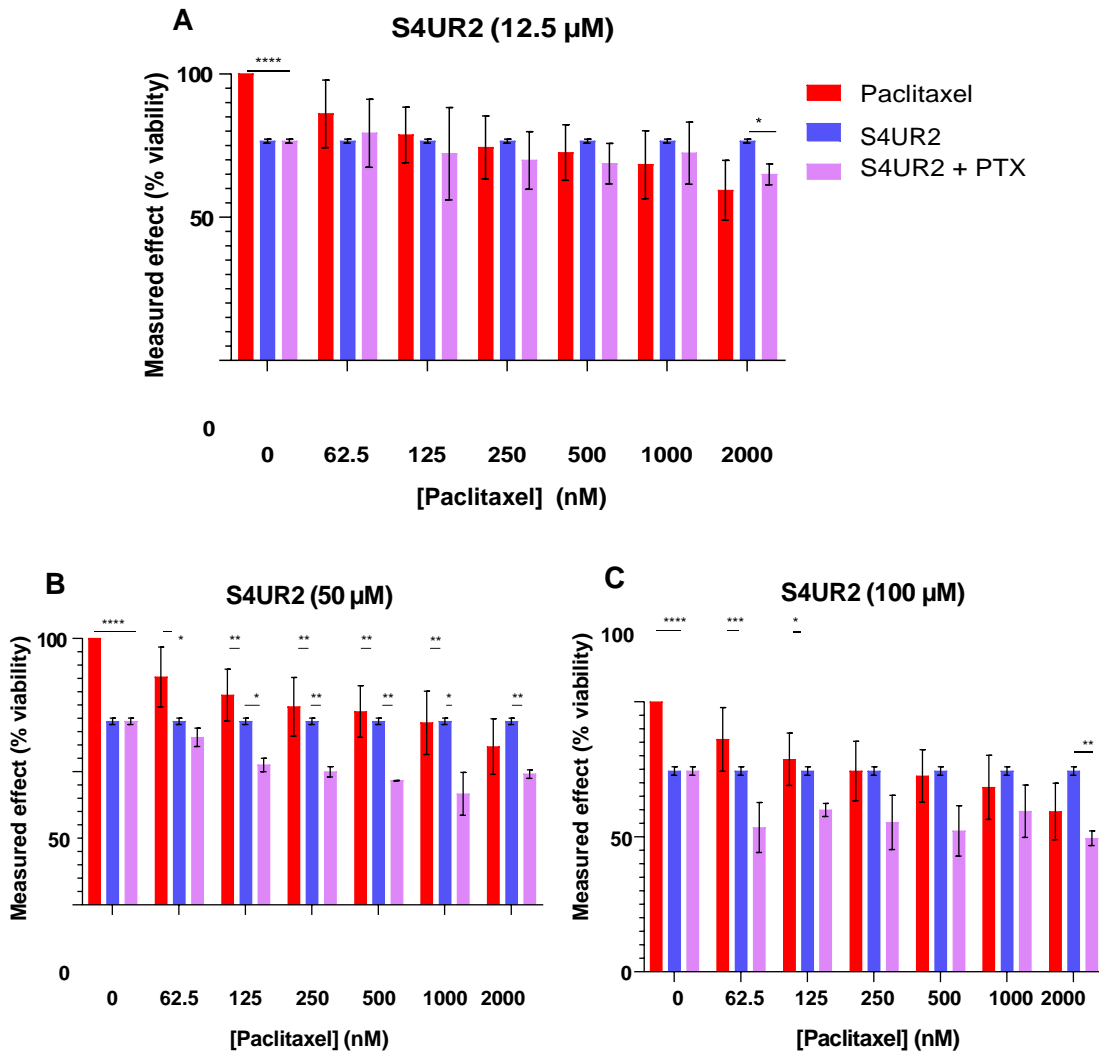


Figura 7-Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7, em concentrações fixas de 12,5 μ M (A), 50 μ M (B) e 100 μ M (C), variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM.

Após observação dos gráficos obtidos na molécula S4UR2 (Figura 7), é possível verificar que há um efeito das terapias combinadas a concentrações mais altas, em comparação com a molécula anterior. Há uma discrepância e uma aditividade da molécula em

combinação com o PTX em relação à monoterapia da R2.

As seguintes figuras 8 e 9, demonstram cada uma três gráficos de barras que representam a eficácia de uma terapia combinada entre PTX e a molécula R1 e R2, respetivamente. Cada gráfico mostra a variação na eficácia com diferentes concentrações das moléculas (0 μM ; 6,25 μM ; 12,5 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 200 μM), enquanto a concentração de PTX é mantida fixa em cada gráfico. Esta é outra forma de analisar os resultados.

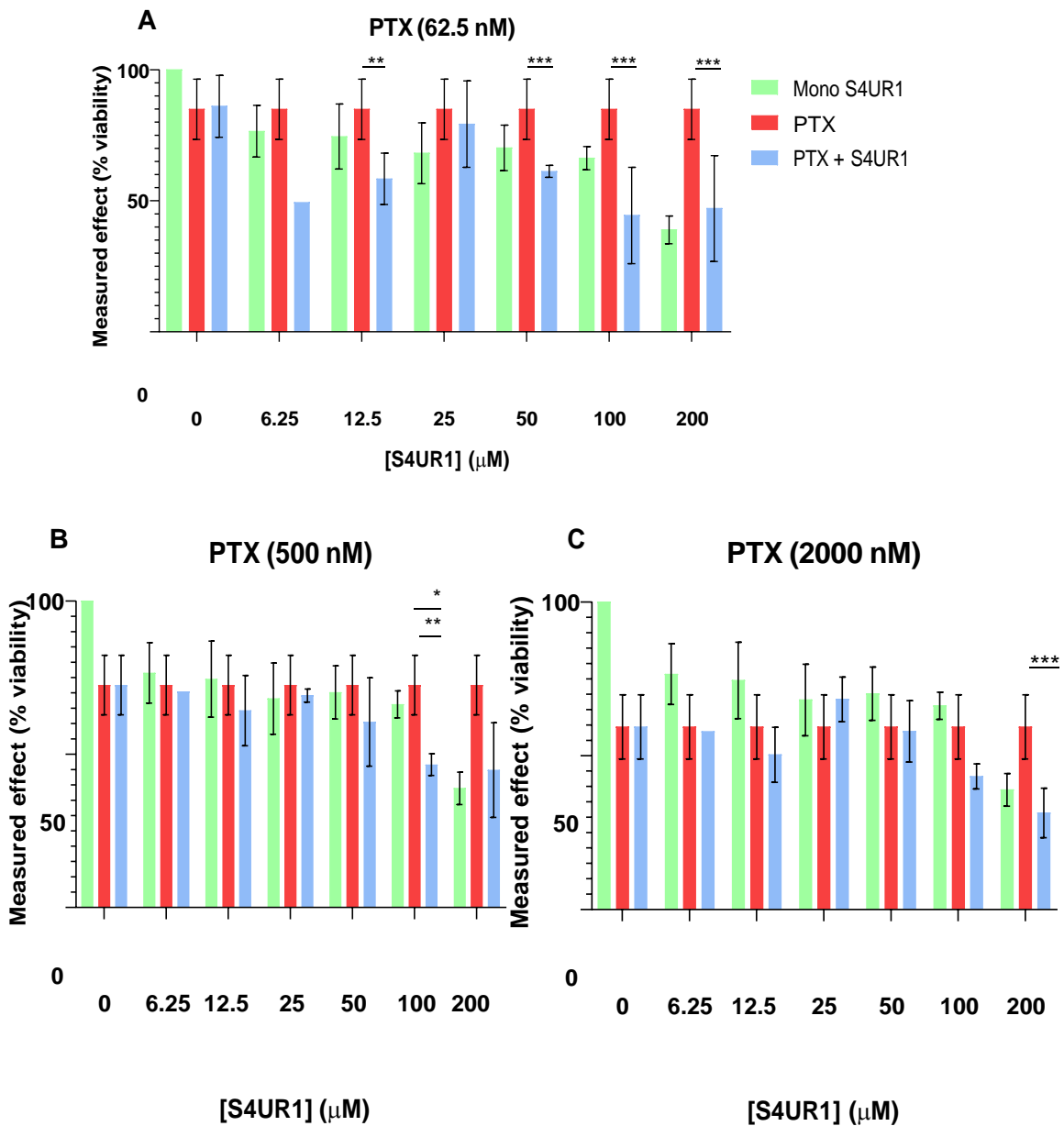
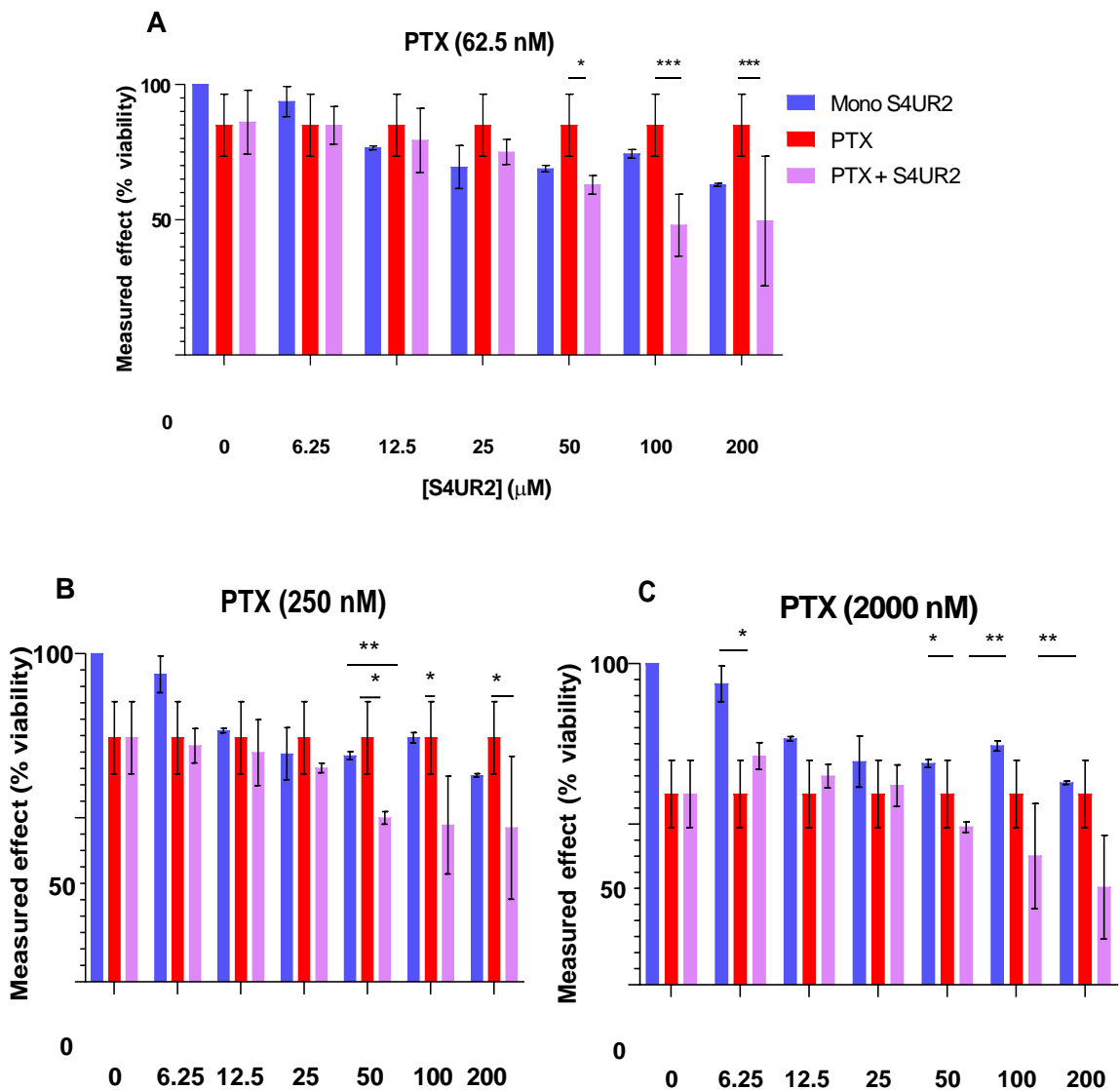


Figura 8 -Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 62,5 nM (A), 500 nM (B) e 2000 nM (C), variando em todas a molécula S4UR1 em concentrações [0-200] μM .

Na figura 8 estão representadas as monoterapias de cada fármaco e a combinação dos dois. A verde é possível ver a monoterapia da molécula S4UR1 a variar em concentrações entre 0 e 200 μM , a vermelho a monoterapia do PTX nas concentrações de 62,5 nM (A), 500 nM (B) e 2000 nM (C). A combinação dos dois fármacos está representada pela barra azul. No gráfico A, é possível ver um efeito de parábola, sendo possível ver uma potenciação na concentração de 6,25 μM com 62,5 nM de PTX, esta potenciação volta a estar presente em concentrações mais elevadas de S4UR1. Nas concentrações de 500 nM e 2000 nM de PTX vemos pouca variação entre o PTX e as terapias combinadas, à semelhança da figura 6.

Na figura 9, à semelhança da anterior é possível verificar que está presente a monoterapia da S4UR2 (azul escuro) em concentrações crescentes. O PTX está fixo em cada gráfico em 3 concentrações diferentes (A-62,5 nM; B- 250 nM; C-2000 nM). Todas as concentrações testadas encontram-se em anexo.



[S4UR2] (μM)

[S4UR2] (μM)

Figura 9- Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 62,5 nM (A), 200 nM (B) e 2000 62,5 nM (C), variando em todas a molécula S4UR2 em concentrações [0-200] μ M.

Aparentemente, analisando os gráficos 9, é possível verificar que o S4UR2 é menos tóxico, devido ao facto que em concentrações mais baixas a viabilidade não se alterar em relação ao PTX, só em concentrações crescentes é que é possível observar uma potenciação do efeito dos compostos combinados na viabilidade. A partir dos 50 μ M é possível ver uma maior morte celular em qualquer concentração de PTX, sendo a concentração da molécula R2 que obtém o presente efeito aditivo.

4.3 Dose-resposta e sinergias linha celular de cancro da mama com os fármacos PTX, S4UR1 e S4UR2

Os seguintes gráficos (Figura 10) fornecem dados sobre a dose resposta dos fármacos combinado com PTX (inibição da viabilidade celular) e os gráficos onde estão presentes as sinergias, no modelo de Loewe. Este foi o modelo matemático selecionado, no entanto em suplemento estão os modelos de ZIP, HSA e BLISS, que revelam a mesmatendência (Anexos- Figura 16 e 17). Na linha superior o gráfico A e B representam a combinação do PTX com a moléculas S4UR1 (Figura 10 - A e B). Na linha inferior está a representação dos gráficos que representam a combinação do PTX com o S4UR2. (Figura 10 - C e D).

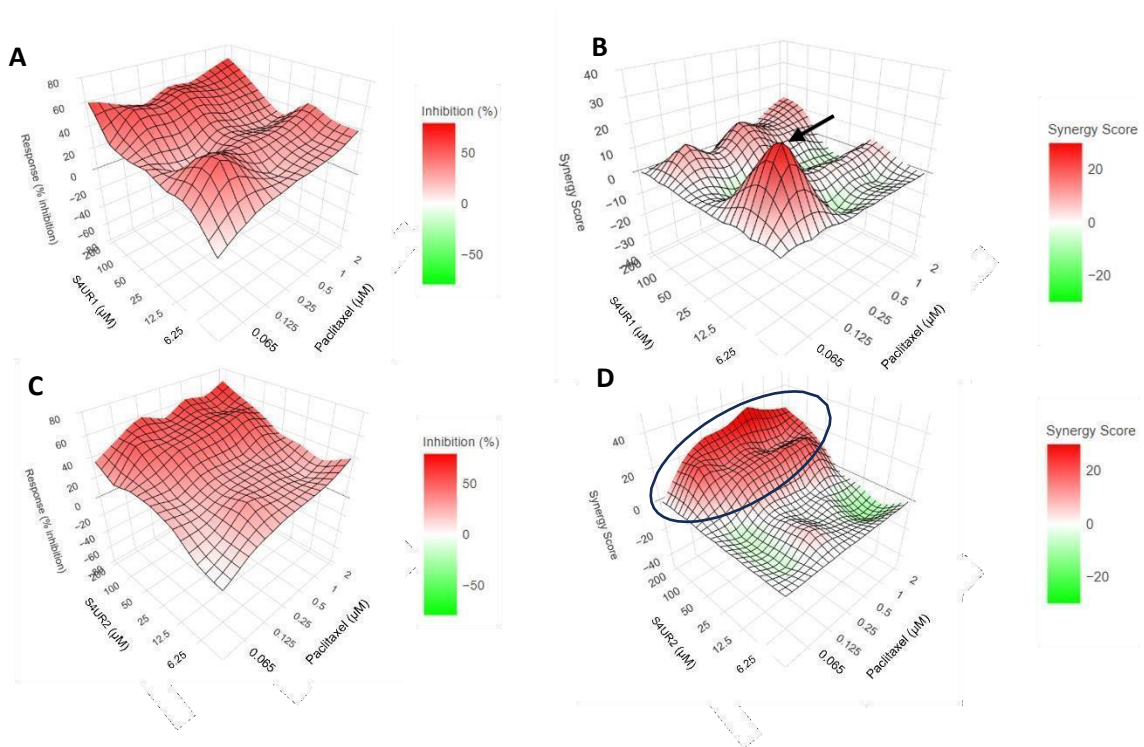


Figura 10- Gráficos de dose resposta das moléculas S4UR1 (A) e S4UR2 (C). Gráficos de pontuação de sinergia das moléculas S4UR1 (B) e S4UR2 (D), realizados no software SynergyFinder, no modelo Loewe.

Nos gráficos A e C (esquerda) é possível ver a dose resposta da combinação entre PTX com S4UR1 ou S4UR2, respetivamente, em relação à inibição celular. Visualmente é possível ver a predominância da cor vermelha o que significa que há uma inibição, (morte celular) maioritariamente superior a 50%.

Nos gráficos presentes à direita da figura 10 (B- combinação PTX+ S4UR1 e D- combinação PTX + S4UR2), é possível verificar a pontuação da sinergia que indica o efeito combinado dos fármacos administrados. O vermelho indica uma potenciação do efeito combinado dos fármacos, demonstrando que o efeito combinado das terapias é maior que o efeito individual, enquanto os verdes indicam um antagonismo das combinações farmacológicas, sendo o efeito combinado menor que os efeitos dos fármacos individualmente.

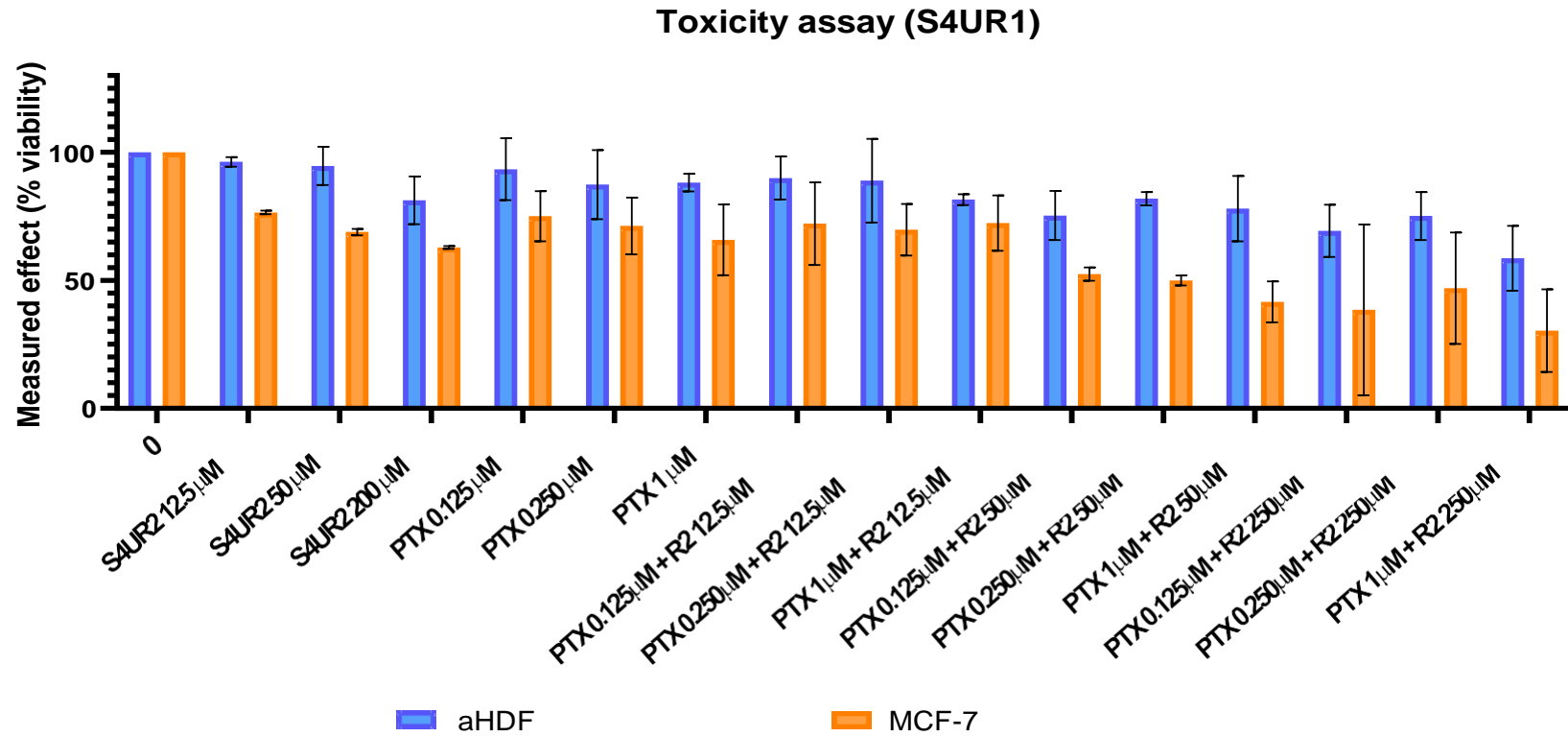
4.4 Resultados de citotoxicidade em células saudáveis em comparação com células cancerígenas

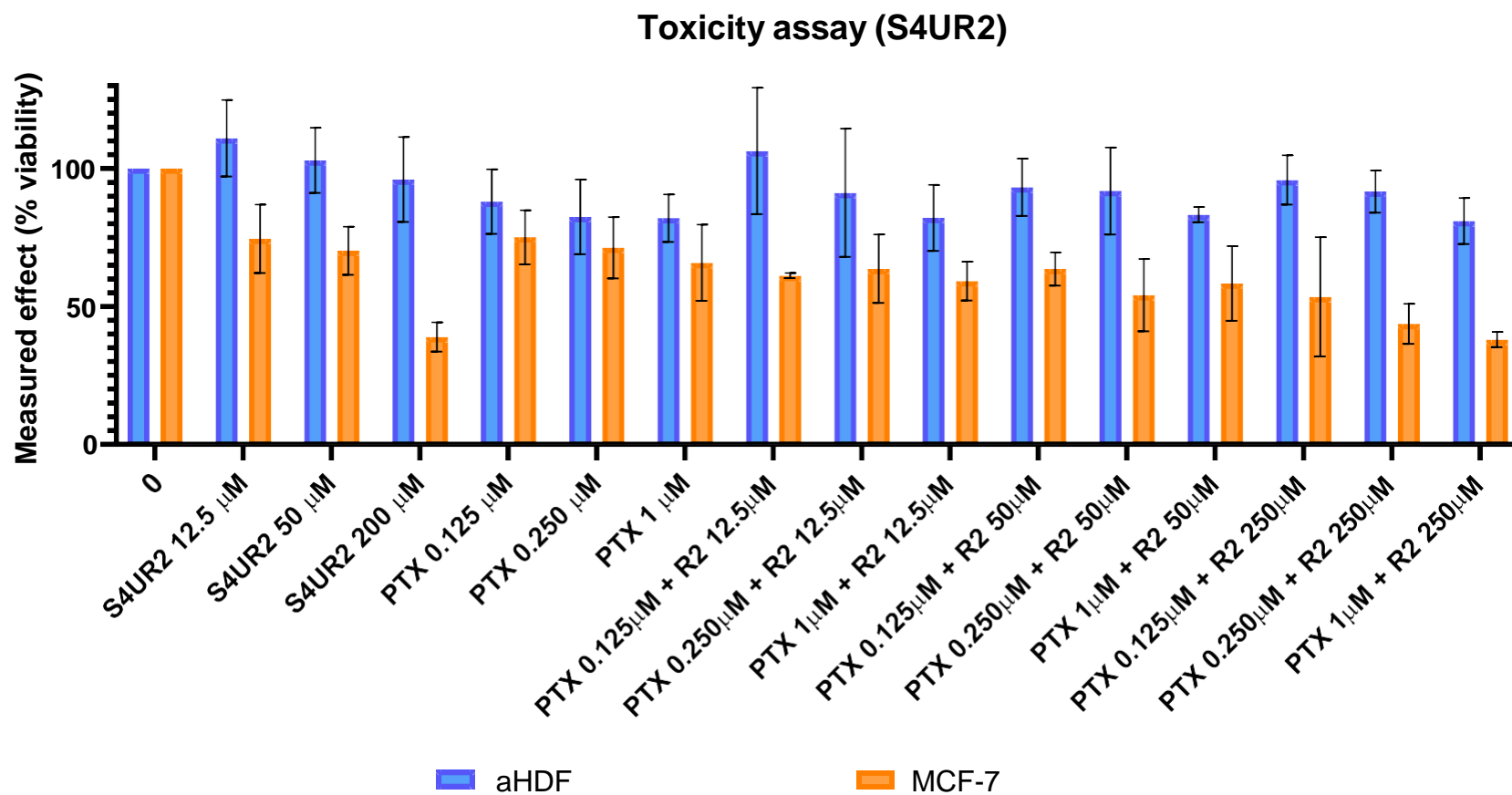
À semelhança do que foi feito anteriormente com MCF-7, houve a necessidade de replicar os ensaios de citotoxicidade em células saudáveis para verificar o efeito dos fármacos na viabilidade destas. A figura 11 representa um gráfico de barras que mostra os resultados do presente ensaio. As barras representam a resposta de dois tipos de células - fibroblastos dérmicos (aHDF) e MCF-7 - em diferentes concentrações. O eixo dos y representa a viabilidade celular e o x as condições de diferentes concentrações e compostos do tratamento. Ambos os ensaios estão designados no eixo do x pela seguinte ordem, a monoterapia da molécula S4UR1 ou R2 em concentrações de 12,5 μM , 50 μM e 200 μM e de PTX , 125 nM, 250 nM e 1 μM . De seguida estão presentes as terapias combinadas conjugando as presentes concentrações descritas anteriormente.

No gráfico A, é possível observar que há uma diferença entre as células saudáveis e cancerígenas em todos os tratamentos. Na monoterapia com S4UR1 e PTX é possível ver a viabilidade celular a diminuir com o aumento da concentração dos presentes fármacos, apesar de ser mais acentuada nas células cancerígenas que nos fibroblastos. Na concentração de 50 μM de monoterapia da molécula R1 é possível verificar que mesmo com a adição do fármaco nas células saudáveis, o desvio padrão apresenta um

aumento da viabilidade superior a 100 %, revelando uma baixa toxicidade em algumas concentrações, durante as 48h de tratamento. Nestes ensaios, o valor mínimo de viabilidade contra aHDF está na ordem dos 60%.

No gráfico B, é possível ver a monoterapia do PTX e da molécula S4UR2 nas mesmas concentrações que a R1, tal como as terapias combinadas. No presente gráfico a tendência celular é muito semelhante à do gráfico anterior, no entanto, é possível verificar (através do desvio padrão) que em determinadas concentrações há um aumento substancial da viabilidade, por vezes superior a 100%. A terapia combinada dos dois fármacos resulta numa redução da viabilidade celular em ambas as linhas, apesar de ser mais significativa nas MCF-7, onde é possível verificar efeitos potenciadores dos fármacos combinados em relação à monoterapia, como demonstrada na secção anterior. O ensaio com a molécula S4UR2 revela-se menos tóxico contra aHDF, onde a viabilidade nas células saudáveis mesmo nas concentrações mais elevadas está compreendida entre 80 e 100%.





B Figura 11- Ensaios de citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos (aHDF) e células cancerígenas (MCF-7). Terapias com S4UR1 (A) e Terapias com S4UR2 (B). No eixo do X encontra-se as concentrações testadas e no y está presente a viabilidade celular.

4.5 Caracterização de canais nociceptivos em animais CIPN através da técnica de Western-Blotting

Após os ensaios de citotoxicidade dos compostos estudados em culturas celulares 2D, é necessário aumentar a complexidade do estudo. Assim, seguiu-se o estudo da expressão proteica dos canais iónicos de ratos CIPN. A técnica de biologia molecular Western-blotting é realizada com o intuito de detetar e quantificar proteínas específicas, como no caso dos canais de Na⁺ para ser possível retirar dados que complementem os dados de citotoxicidade.

Os resultados descritos reportam a presença e a quantificação relativa de um canal iónico com um papel fundamental no mecanismo neurofisiológico da dor, o qual também poderá estar associado ao processo fisiopatológico da CIPN (dados prévios Sea4Us). Na imagem A está representada a membrana de um WB com as bandas correspondentes à proteína de interesse (Nav 1.7) e as bandas correspondentes ao controlo (β -actina) para normalizar a quantidade de proteína.

No gráfico de barras (Figura 12 - B), está quantificada a intensidade das bandas da proteína de interesse. Cada barra está representada um tratamento correspondente às barras na membrana.

Os resultados apresentados poderão demonstrar tendências biológicas, ainda não sendo possível retirar observações conclusivas, pois o tamanho da amostra é reduzido (n=1) (Figura 12).

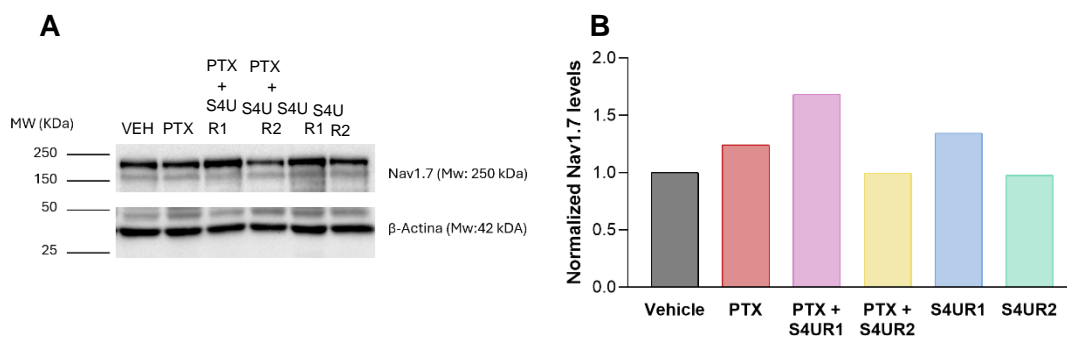


Figura 12- Estudo da expressão de canais iónicos (Nav 1.7) em DRGs (A). Quantificação da expressão em função do *loading control* (β -actina) (B).

Através dos resultados obtidos, é possível comparar as diferenças de expressão proteica entre animais veículo (cinzento) e animais tratados com PTX (vermelho), PTX+S4UR1 (violeta), PTX+ S4UR2 (amarelo), S4UR1 (azul) e S4UR2 (verde).

A quantificação permite normalizar resultados para garantir que as diferenças observadas se devam à expressão proteica (bandas superiores) e não a variações de carga da amostra. Todas as normalizações foram efetuadas através da β -actina.^{[32] [33]} É possível observar que, em animais tratados com S4UR2 (em combinação com PTX ou individualmente), a expressão de canais Nav 1.7 se assemelha a animais controlo (veículo), havendo um aumento de sinal em animais tratados com S4UR1 (em combinação com PTX ou individualmente), potencialmente por alterações moleculares ao nível funcional e/ou por um aumento de expressão.

5. Discussão

Como referido anteriormente, a CIPN é uma condição debilitante que inviabiliza a qualidade de vida dos pacientes que a adquirem, sendo necessário por vezes ajustar as doses da quimioterapia base, ou até suspender o tratamento, sendo uma das principais razões dos pacientes não completarem o ciclo de tratamento. No entanto, até ao momento, não existe nenhum método eficaz para a prevenção da CIPN.

Recentemente, a Sea4Us identificou duas moléculas com inspiração na química marinha (S4UR1 e S4UR2), já aprovadas como fármacos anticancerígenos no mercado. Foi anteriormente demonstrado na Sea4Us que estas moléculas têm atividade ao nível dos canais de sódio em neurónios hiper-estimulados de modelos animais CIPN, construindo um pressuposto científico para a sua atividade analgésica e/ou neuromodulatória neste modelo patológico. Além disso, foi demonstrado anteriormente pela Sea4Us que estes compostos quando administrados em conjunto com PTX em modelos animais (ratazana), levam à prevenção da dor associada à CIPN, por comparação com animais tratados com PTX apenas. Assim, o presente estágio teve como principal objetivo avaliar a eficácia de PTX quando coadjuvado com as moléculas S4UR1 e S4UR2, de modo a avaliar a sua compatibilidade terapêutica, numa linha de cancro de mama sensível a PTX (MCF-7).

Em relação às terapias combinadas entre PTX e S4UR1 (Figura 6), foi demonstrado que a eficácia anticancerígena do PTX não parece ser afetada, não sendo visível um

antagonismo ou uma potenciação relativamente à terapia *standard* (monoterapia PTX), sendo provavelmente fármacos independentes um do outro no que diz respeito à atividade anticancerígena. Nos gráficos A e B da molécula S4UR1 é possível observar que não existe uma grande variação da atividade dos compostos combinados, mas sim uma estagnação do efeito nas células, sendo a viabilidade celular muito semelhante. Só em concentrações mais altas, tais como 200 μM S4UR1, é possível ver uma maior morte celular. Podemos conferir que a viabilidade é muito semelhante na monoterapia de S4UR1 à molécula conjugada com o PTX. No entanto, embora o efeito geral do tratamento combinado seja de uma independência, nas concentrações mais baixas de ambos os fármacos (PTX e S4UR1), existe uma possível potenciação quando co-administrados.

Curiosamente, em dados prévios obtidos na empresa, o presente ensaio foi validado em outra linha celular de cancro da mama, a linha triplo-negativa MDA-MD-231 (dados não mostrados). Porém os resultados obtidos não corroboram com os presentes neste relatório a nível da molécula S4UR1, visto ter havido um incremento de 20% na eficácia do PTX quando coadministrados nesta linha celular. Deste modo, poderemos inferir que os resultados obtidos neste relatório poderão ser específicos da linha celular MCF-7.

Em relação à combinação de PTX e S4UR2 (Figura 7), podemos concluir que a eficácia do tratamento com PTX não foi afetada, e que ao adicionar estas moléculas combinadas obtemos um efeito potenciador, atingindo um máximo de cerca de 20% de potenciação, sendo esse efeito mais evidente em concentrações superiores de S4UR2. É de notar que nos ensaios *in vitro* testados em MCF-7, a molécula S4UR2 induziu um efeito menos citotóxico em comparação com a R1. Estes dados estão em conformidade com os anteriormente obtidos em MDA-MD-231 (dados não mostrados).

É ainda de salientar, que relativamente à monoterapia com PTX (Figura 5 - A) que a percentagem de viabilidade estagna a cerca dos 60-70% independentemente do aumento da concentração. Neste sentido, é importante referir que existe uma baixa solubilidade aquosa dos fármacos em estudo (PTX, S4UR1 e S4UR2). Em ensaios *in vitro* com linhas celulares é necessário preparar as soluções *stock* destes compostos em solventes orgânicos, tais como o DMSO, para serem posteriormente diluídos em meio de cultura nas concentrações de trabalho, para o ensaio *in vitro*. No caso do PTX, este torna-se mais solúvel em água quando a 4 graus ^[34]. No entanto, é de referir que quando em temperaturas acima dos 30°C^[34], tem tendência a degradar e precipitar. Como tal, durante uma incubação de 48 horas a 37°C é espectável que parte do fármaco

tenha precipitado, podendo não atingir a concentração teórica inicialmente calculada. Além dos problemas de solubilidade o PTX é pouco estável, degradando-se ao longo do tempo [34]. Está descrito que existe a degradação total do PTX em temperaturas a partir de 70 °C, num período de 150 minutos [35], como tal sendo expectável alguma degradação a 37 °C assim, é possível que ao longo deste período de incubação do tratamento, haja uma degradação e precipitação dos fármacos, justificando o facto que apesar de estar a elevadas concentrações o efeito do composto estagna e a morte celular mantém-se, provavelmente atingindo assim a saturação [36].

Este problema também é verificado na clínica sendo que existem métodos de melhoramento, através do uso de solventes orgânicos, como o Cremophor EL e etanol, para solubilizar os fármacos, também é possível melhorar a solubilidade do PTX em água, com ciclodextrinas, visto que estas são oligossacarídeos que podem formar complexos de inclusão do PTX. Numa outra abordagem de observação dos dados, ao fixar a concentração de PTX (Figura 8), e variando a concentração da molécula S4UR1, é possível identificar, também, um ponto potenciador em concentrações menores, (6,25 µM de S4UR1 com 62,5 nM de PTX), esta concentração em específico demonstra que houve uma potenciação do efeito das terapias combinadas, porém ao contrário das outras é um n=1. Para confirmar esta adição é necessário dar mais robustez aos resultados realizando novos ensaios. Havendo uma estagnação em concentrações intermédias. O que nos permite concluir que efeitos potenciadores com S4UR1 são encontrados em rácios de concentrações específicos. Por outro lado, variando as concentrações da molécula S4UR2 (Figura 9) quando a concentração de PTX é fixa, é possível observar que existe um efeito potenciador a partir dos 50 µM S4UR2, até concentrações mais elevadas, num intervalo de concentrações mais amplo.

Com os dados obtidos nos estudos in vitro foi possível analisar os resultados numa abordagem mais ampla, através do software SynergyFinder, uma ferramenta bioinformática utilizada para analisar e quantificar a sinergia entre dois ou mais fármacos, proporcionando uma abordagem quantitativa e detalhada da interação dos fármacos em estudo. Na molécula S4UR1 (Figura 10 A e B) é possível verificar a eficácia da combinação do presente fármaco com o PTX, sendo capaz de inibir a viabilidade celular (A), representando que não são antagonistas. No gráfico B, é possível ver a interação dos fármacos (gráficos de sinergia) e verificar as concentrações nas quais há um efeito potenciador (mancha vermelha), neste caso será a 0,0625 µM de PTX e 6,25 µM de R1. Assim é possível verificar uma maior eficácia dos fármacos quando

coadministrados nestas concentrações mais baixas, assim como referido anteriormente. Na molécula S4UR2, do presente gráfico, também é possível verificar a eficácia dos fármacos combinados (C), não demonstrando antagonismo. No gráfico D, à semelhança da molécula anterior, está presente o gráfico das sinergias onde é possível fazer a leitura com o mesmo intuito de verificar em qual/quais concentrações está presente um efeito potenciador, ao contrário da molécula R1, as concentrações de potenciação são as mais altas, a partir dos 50 μM até aos 200 μM de S4UR2 em qualquer concentração de PTX, desde 0,065 μM até 2 μM . Esta análise visual dos gráficos de dose-resposta e de sinergia, sugere que ambos os fármacos adicionados ao PTX não revelam um efeito antagonista, sendo este o principal foco do estudo.

Adicionalmente, para avaliar a eficácia de um fármaco ou combinação de vários fármacos, é necessário comparar células saudáveis com as cancerígenas. Idealmente o composto deverá ser mais tóxico para as MCF-7, em comparação com células saudáveis. Assim, é imprescindível realizar um ensaio de citotoxicidade em aHDF, uma linha primária que recapitula o tecido saudável.

Nos gráficos apresentados na figura 11, é possível verificar tendências, é perceptível que a viabilidade das células MCF-7 diminui com o aumento das concentrações de R1 (A) e R2 (B), no entanto, as aHDF não demonstram serem mais afetadas por S4UR1 e R2 até concentrações mais altas, comparando com a linha celular cancerígena. Em relação ao PTX é possível verificar que há um efeito tóxico nas MCF-7 e nos fibroblastos há alguma redução da viabilidade, mas menos pronunciada que nas células cancerígenas. Comparando as duas moléculas combinadas com PTX é possível verificar que ambas mostram eficácia na redução da viabilidade nas MCF-7, apesar de na S4UR2 haver um efeito mais pronunciado em algumas concentrações. Por outro lado, as células aHDF são menos afetadas por ambos os fármacos em todas as concentrações testadas, diminuindo a viabilidade à medida que aumenta a concentração, no entanto esta diminuição não é inferior àquela observada nas células cancerígenas. Após a análise dos resultados é possível concluir que a premissa de haver maior morte celular nas MCF-7 em relação aos aHDF foi demonstrada, assim é possível afirmar que o tratamento não é mais tóxico para as células saudáveis, evitando efeitos de toxicidade excessiva, num futuro, em organismos vivos.

É destacar ainda que os resultados dos ensaios in vitro aqui apresentados, permitem-nos verificar compatibilidades farmacológicas num estadio experimental ainda preliminar, em modelos 2D de doença. Neste sentido poderá ser também importante

estender os ensaios a outras linhas de cancro de mama e também avaliar o efeito em linhas celulares primárias de pacientes, tendo em consideração a variabilidade genética de cada linha celular. Para concluir o objetivo principal desta linha experimental é necessário observar estas provas preliminares de que determinadas concentrações de PTX e os fármacos em estudo poderão ter um efeito aditivo e/ou potenciador que poderá aumentar a eficácia do tratamento quimioterapêutico além do efeito neuromodulatório e/ou mitigador da CIPN, apesar de ainda haver um longo caminho a percorrer.

Assim, de modo a aumentar a complexidade experimental, os passos seguintes serão avaliar a citotoxicidade dos compostos em co-culturas, visto ser um modelo estruturalmente mais complexo devido ao facto de haver interação entre diferentes tipos de células no mesmo nicho. Assim, no futuro poderão vir a ser utilizadas co-culturas heterotípicas consistindo na utilização de diferentes tipos celulares que interagem entre si, tais como fibroblastos e células cancerígenas [37]. Para aumentar a complexidade do estudo, também podem ser utilizados esferóides, sendo estes, culturas em suspensão que permitem a formação de estruturas esféricas multicelulares, promovendo interações célula-células em 3D [38].

Após realizado o estudo da citotoxicidade in vitro com o intuito de verificar a eficácia dos compostos em teste, houve a necessidade de uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares associados à dor neuropática, assim recorreremos à técnica de western-blotting, para estudar as vias de sinalização envolvidas. É de notar, que os resultados obtidos por western-blotting ainda não são cientificamente significativos (n=1), existindo assim a necessidade de repetir o ensaio com mais amostras para confirmar a validade dos resultados. A interpretação da figura 12 (A) revela uma consistência nas bandas inferiores (B-actina), sendo uniformes na intensidade, logo é possível a quantificação precisa das bandas da proteína de interesse. As bandas superiores, correspondentes à proteína de interesse (Nav 1.7) com um peso molecular de 250 kDa, apresentam diferentes intensidades e diferentes níveis de expressão da proteína, em diferentes condições de tratamento. Ao comparar, é possível verificar que o animal representado pela barra violeta (PTX+ S4UR1) apresenta a maior expressão da proteína de interesse, seguido pela barra azul (Monoterapia S4UR1). Assim, podemos inferir que a condição representada pela barra violeta pode estar associada a uma maior atividade neuronal ou aumento da dor neuropática. Relativamente às barras amarela (PTX+S4UR2) e verde (S4UR2), estão muito semelhantes ao grupo veículo o que pode estar associado a uma menor atividade neuronal ou a uma inibição da dor

neuropática, visto que uma menor expressão de Nav 1.7 pode resultar em um menor sinal de dor, relativamente ao grupo tratado com PTX apenas (barra vermelha).

Com o intuito de aumentar a robustez do presente estudo, será necessário aumentar o número de repetições e estudar os canais de sódio associados à dor neuropática, tal como o Nav 1.8 e Nav 1.9.

Em conclusão, de acordo com os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, é possível verificar que o fármaco S4UR2 é um bom candidato a uma terapêutica co- adjuvante com PTX, devido ao seu efeito potenciador numa ampla gama de rácios de tratamento. E também de acordo com os resultados obtidos no ensaio de WB, esta molécula demonstrou um efeito potencialmente superior ao efeito de S4UR1, no que diz respeito à manutenção do perfil de expressão de canais Nav 1.7. No entanto, como descrito anteriormente, será necessário realizar mais testes de modo a oferecer maior robustez ao presente estudo.

6. Conclusão

O presente estágio teve como foco o contacto com a área laboratorial em contexto profissional, adquirindo assim novas competências e *skills* laboratoriais incidindo no estudo de uma terapia de prevenção à CIPN.

As conclusões do trabalho experimental desenvolvido ao longo dos últimos meses são as seguintes:

- Os compostos testados não afetam a baseline terapêutica do PTX, podem assim, ambos ser um co-adjuvante para a quimioterapia, não afetando o tratamento anticancerígeno base.
- À semelhança do que acontece na linha celular MCF-7, os compostos induzem morte celular nas células de fibroblastos dérmicos, mas nunca apresentam uma viabilidade menor em comparação com as células cancerígenas.
- Ao contrário dos testes anteriores em células MDA-MD-231, o S4UR1 é mais tóxico e não tem um potencial anticancerígeno aditivo em MCF-7.
- O S4UR2 tem um potencial anticancerígeno aditivo quando coadministrado com PTX em concentrações mais elevadas, sendo menos tóxico, de acordo com o testado *in house*.
- Ao aumentar as concentrações dos compostos administradas existe uma maior variabilidade nos resultados.

- Devido ao $n=1$ ainda não é possível retirar conclusões científicas, no entanto há uma sugestão que a molécula S4UR2 tenha uma menor atividade neuronal, ou uma diminuição da dor neuropática, no entanto é essencial mais estudos.

7. Conclusions

This internship focused on contact with the laboratory area in a professional context, thus acquiring new competencies and laboratory skills, focusing on the study of a therapy to prevent CIPN.

The conclusions of the experimental work carried out over the last few months are as follows:

- The compounds tested do not affect the therapeutic baseline of PTX, so they can both be a co-adjuvant to chemotherapy, without affecting the basic anti-cancer treatment.
- As with the MCF-7 cell line, the compounds induce cell death in dermal fibroblast cells, but they never have a lower viability compared to cancer cells.
- Unlike the previous tests on MDA-MD-231 cells, S4UR1 is more toxic and does not have an additive anticancer potential on MCF-7.
- S4UR2 has an additive anticancer potential when co-administered with PTX at higher concentrations, and is less toxic, according to in house testing in house. As the concentrations of the compounds administered increase, there is greater variability in the results.
- Due to the n=1 it is not yet possible to draw scientific conclusions, however there is a suggestion that the S4UR2 molecule has a lower neuronal activity, or a decrease in neuropathic pain.

8. Proposta de Projeto de Investigação

Com base no trabalho desenvolvido ao longo do estágio curricular, surgiu a necessidade de aprofundar as propostas de investigação e aumentar a complexidade do estudo, tendo por base a formulação dos compostos S4UR1 e S4UR2 como co-adjuvantes na quimioterapia, com o objetivo de mitigar/ prevenir o desenvolvimento da CIPN através da validação da adequação destes compostos como co-adjuvantes para a quimioterapia de PTX, assegurando a eficácia do tratamento anticancerígeno basal.

Título: terapia combinada de ptx com S4UR1 e 2: Teste de eficácia tumoral *in vivo*

Objetivo: A proposta de investigação apresentada tem como principal objetivo verificar se um modelo de murganhos induzido com cancro da mama, da linha celular MCF-7, apresenta melhorias na carga tumoral quando coadjuvado ao PTX adicionar-se S4UR1 ou S4UR2, prevenindo a dor associada à CIPN.

Pertinência: Os ensaios *in vitro* testados até ao momento em 2D são amplamente utilizados devido à sua simplicidade e baixo custo, apesar de apresentarem limitações quando comparados em modelos *in vivo* de murganhos, visto que as células crescem em monocamada numa superfície plana, assim não reflete a complexidade tridimensional de um tumor *in vivo* [39].

A avaliação da redução tumoral em murganhos é uma prática comum e revelante para a pesquisa pré-clínica.

Metodologia: Para induzir cancro da mama em murganhos utilizando células MCF-7 é necessário implantar células tumorais humanas em ratinhos imunodeficientes. O procedimento geral inclui cultivar as células MCF-7 em condições adequadas para a cultura celular, em meio DMEM, (preparação semelhante ao ponto 3.1) [40].

Para o decorrer do presente estudo haverá 6 grandes grupos de ratinhos, para se analisar todas as condições possíveis: grupo veículo, PTX, S4UR1, S4UR2, PTX+ S4UR1 e PTX+ S4UR2.

A injeção das células MCF-7 é realizada na glândula mamária do ratinho anestesiado, numa concentração de $1-5 \times 10^6$ células por rato em todos os ratinhos do estudo [41],[42].

Após o desenvolvimento do cancro da mama, todos os ratinhos (exceto o veículo) serão administrados com 10 mg/kg de PTX de 2 em 2 dias e preparados com o veículo mistura KES (1:1:8 Kolliphor:Ethanol:Saline).

Os grupos das monoterapias das moléculas e da combinação com o PTX, serão subdivididos em grupos, onde se testa 2 concentrações por cada molécula, visto ser um estudo piloto e ser necessário testar várias concentrações para saber a ideal.

Von Frey: Para testar o desenvolvimento da dor neuropática e mitigação da CIPN é necessário avaliar a resposta do animal a um estímulo que normalmente não é doloroso, exceto na presença de determinadas condições ^[43], tal como o Von Frey.

A sensibilidade da nocicepção mecânica é medida pelo teste Von Frey, que consiste em pressionar verticalmente filamentos na sola das patas, traseiras e dianteiras, visto ser uma dor generalizada e periférica, até o animal retirar o membro ^[44]. Este procedimento é repetido 5 vezes para ser possível retirar dados possíveis de ser quantificados e analisados.

Cold plate: Com o intuito de testar a sensibilidade térmica será utilizado o teste Cold plate. Os murganhos serão expostos a uma temperatura de 2-2,5 °C, durante 5 minutos. Serão analisados os estímulos motores como coçar a pata, levantar uma das patas brevemente no mesmo lugar, ou saltar ^{[44],[45]}.

Western-Blotting: A extração de proteínas, o protocolo de eletroforese e a transferência serão iguais à descrita anteriormente no ponto 3.1 da metodologia.

Para marcar as proteínas de interesse, correspondente aos canais de sódio, com o intuito de ver a expressão proteica dos mesmos, será utilizado o anticorpo anti-Nav 1.7, anti-Nav 1.8 anti-Nav 1.9

Análise Estatística: Os resultados serão obtidos através da análise de diferentes softwares como Microsoft Excel (Microsoft Office 2013 Professional Plus®), GraphPad Prism 6.01 (Window, GraphPad Software, San Diego California USA).

Resultados esperados: Com base numa meticulosa observação, análise e interpretação dos resultados é previsto que seja possível verificar numa primeira instância ao nível do grupo veículo o desenvolvimento do tumor mamário, no grupo tratado com PTX é esperado que haja uma redução da carga tumoral associado ao desenvolvimento da condição CIPN. Nos grupos das terapias combinadas o primeiro passo é comparar com o modelo tratado com PTX e verificar que a redução tumoral não foi anulada, esperando assim que haja uma atividade de prevenção em relação à CIPN, sendo este o principal objetivo. No entanto será verificada também uma possível potenciação entre os compostos e uma possível redução na carga tumoral comparando

ao modelo tratado com PTX, havendo uma potenciação das moléculas, sempre com o foco de validar as moléculas S4UR1 e R2 como coadjuvantes do modelo standard de quimioterapia.

9 Referências bibliográficas

1. Sea4Us [Internet]. 2023 [cited 2023 Dez 11]. Available from: <https://sea4us.pt/en/sobre-nos/mission-vision/>.
2. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável [Internet]. 2023 [cited 2023 Dez 11]. Available from: <https://ods.pt/>.
3. Ferlay, J., et al. (2018). *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018*. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 103, 356–387.
4. Siegel, R. L., et al. (2023). *Cancer statistics, 2023*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17–48.
5. ONU News [Internet]. 2024 [cited 2024 Jan 09]. Available from: [Página inicial - Nações Unidas - ONU Portugal \(unric.org\)](#).
6. Jasmin, Luc, et al. “The Cold Plate as a Test of Nociceptive Behaviors: Description and Application to the Study of Chronic Neuropathic and Inflammatory Pain Models.” *Pain*, vol. 75, no. 2, Jan. 1998, pp. 367–382.
7. Meldrum, C., et al. (2011). *Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective*. *The Clinical biochemist. Reviews*, 32(4), 177–195.
8. Miller, K. D. et al. *Cancer treatment and survivorship statistics, 2022*. *ACS Journals* 343, 1–28 (2022).
9. Anand, Utpal, et al. “Cancer Chemotherapy and Beyond: Current Status, Drug Candidates, Associated Risks and Progress in Targeted Therapeutics.” *Genes & Diseases*, vol. 10, no. 4, 18 Mar. 2022.
10. Marupudi, N. I., et al. (2007). *Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies*. *Expert opinion on drug safety*, 6(5), 609–621.
11. Fumagalli, G., et al. (2021). *Neuroinflammatory Process Involved in Different Preclinical Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. *Frontiers in immunology*, 11, 626687.
12. Scuteri, A., et al. (2006). *Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells*. *Anticancer research*, 26(2A), 1065–1070.
13. Maihöfner, C., et al. (2021). *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): current therapies and topical treatment option with high-concentration capsaicin*. *Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 29(8), 4223–4238.

14. Desforges, A. D., et al. (2022). *Treatment and diagnosis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: An update. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 147, 112671.
15. Burgess, J., et al. (2021). *Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Pathomechanisms and Treatment. Oncology and therapy*, 9(2), 385–450.
16. Seretny, M., et al. (2014). *Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. Pain*, 155(12), 2461–2470.
17. Colvin LA., (2019). *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: where are we now? Pain*. 2019;160(Suppl 1):S1–S10.
18. Xu, Y., et al. (2022). *Mechanisms underlying paclitaxel-induced neuropathic pain: Channels, inflammation and immune regulations. European journal of pharmacology*, 933, 175288.
19. Iftinca, M., et al. *TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions. Drugs* 81, 7–27 (2021).
20. Brouwer, Brigitte A., et al. “Painful Neuropathies: The Emerging Role of Sodium Channelopathies.” *Journal of the Peripheral Nervous System*, vol. 19, no. 2, June 2014, pp. 53–65.
21. Deng, L., et al. (2023). *Nav1.7 is essential for nociceptor action potentials in the mouse in a manner independent of endogenous opioids. Neuron*, 111(17), 2642–2659.e13.
22. Schaffler, M. D., et al. (2019). *Mechanisms of Tactile Sensory Phenotypes in Autism: Current Understanding and Future Directions for Research. Current psychiatry reports*, 21(12), 134.
23. Bernardo, A. (2023). *Estágio em neurofisiologia e microbiologia: Implementação da linha celular imortalizada F-11 em estudos da dor. (Relatório de estágio de mestrado em Tecnologias-Clinico Laboratoriais) Escola Superior de Tecnologia da saúde de Lisboa, Lisboa.*
24. Vellei, Marika, et al. *Dynamic Thermal Perception: A Review and Agenda for Future Experimental Research*. Vol. 205, no. 108269, 2021.
25. Kis, Brigitta, et al. “Antimicrobial Activity, in Vitro Anticancer Effect (MCF-7 Breast Cancer Cell Line), Antiangiogenic and Immunomodulatory Potentials of *Populus Nigra* L. Buds Extract.” *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 22, no. 1, 16 Mar. 2022.

26. Abreu Costa, Lucas, *et al.* “Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes.” *Molecules*, vol. 22, no. 11, 10 Nov. 2017, p. 1789.
27. Mishra, Manish, *et al.* “Protein Purification and Analysis: Next Generation Western Blotting Techniques.” *Expert Review of Proteomics*, vol. 14, no. 11, 13 Oct. 2017, pp. 1037–1053
28. Taylor, Sean C., *et al.* “A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data.” *Molecular Biotechnology*, vol. 55, no. 3, 25 May 2013, pp. 217–226.
29. Chegão, Ana, *et al.* “Glycation Modulates Glutamatergic Signaling and Exacerbates Parkinson’s Disease-like Phenotypes.” *Npj Parkinson’s Disease*, vol. 8, no. 1, 25 Apr. 2022.
30. Larsson, Peter, *et al.* “Optimization of Cell Viability Assays to Improve Replicability and Reproducibility of Cancer Drug Sensitivity Screens.” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, 2 Apr. 2020, p. 5798.
31. Ghosh, Rajeshwary, *et al.* “The Necessity of and Strategies for Improving Confidence in the Accuracy of Western Blots.” *Expert Review of Proteomics*, vol. 11, no. 5, 25 July 2014, pp. 549–560.
32. Yang, Qilei, *et al.* “Enhanced Water Solubility and Oral Bioavailability of Paclitaxel Crystal Powders through an Innovative Antisolvent Precipitation Process: Antisolvent Crystallization Using Ionic Liquids as Solvent.” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 11, 22 Oct. 2020, p. 1008.
33. Scripture, Charity, *et al.* “Comparative *in Vitro* Properties and Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Following the Administration of Taxol® and Paxene®.” *Cancer Biology & Therapy*, vol. 4, no. 5, May 2005, pp. 555–560.
34. Tian, J., *et al.* “Degradation of Paclitaxel and Related Compounds in Aqueous Solutions II: Nonpimerization Degradation under Neutral to Basic PH Conditions.” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, no. 8, Aug. 2008, pp. 3100–3108.
35. Mahmood Barani, *et al.* “*In Vitro* and *in vivo* Anticancer Effect of PH-Responsive Paclitaxel-Loaded Niosomes.” *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, vol. 32, no. 12, 1 Dec. 2021.

36. Vos, K.J., Martin, A.G., Trimboli, M.G. *et al.* A (2014) “Multi-compartment pharmacokinetic model of the interaction between paclitaxel and doxorubicin.” *EPJ Nonlinear Biomed Phys* **2**, 13
37. Huch, M., *et al.* “Modeling Mouse and Human Development Using Organoid Cultures.” *Development*, vol. 142, no. 18, 15 Sept. 2015, pp. 3113–3125.
38. Pampaloni, Francesco, *et al.* “The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 10, 2007, pp. 839–45.
39. Swami, Srilatha, *et al.* “Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression *in vivo*.” *Hormones & Cancer*, vol. 2, no. 3, 1 June 2011, pp. 190–202.
40. Bruna, A., *et al.* (2016). *TGFβ* induces the formation of tumour-initiating cells in claudinlow breast cancer. *Nature Communications*, 7, 10787.
41. Tseng, William W., *et al.* “Development of an Orthotopic Model of Invasive Pancreatic Cancer in an Immunocompetent Murine Host.” *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 14, 9 June 2010, pp. 3684–3695.
42. Chaplan, S. R., *et al.* “Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw.” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 53, no. 1, 1 July 1994, pp. 55–63.
43. Shao, Shuai, *et al.* “Divanillyl Sulfone Suppresses NLRP3 Inflammasome Activation via Inducing Mitophagy to Ameliorate Chronic Neuropathic Pain in Mice.” *Journal of Neuroinflammation*, vol. 18, no. 1, 24 June 2021.
44. Bennett, Gary J., *et al.* “A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation like Those Seen in Man.” *Pain*, vol. 33, no. 1, Apr. 1988, pp. 87–107.
45. Jasmin, Luc, *et al.* “The Cold Plate as a Test of Nociceptive Behaviors: Description and Application to the Study of Chronic Neuropathic and Inflammatory Pain Models.” *Pain*, vol. 75, no. 2, Jan. 1998, pp. 367–382.

10 Anexos

O presente anexo contém os resultados de todos os ensaios de citotoxicidade desenvolvidos ao longo do presente estágio curricular.

Foram testadas concentrações de 0-200 μM de S4UR1 e R2 e 0-2000 nM de PTX.

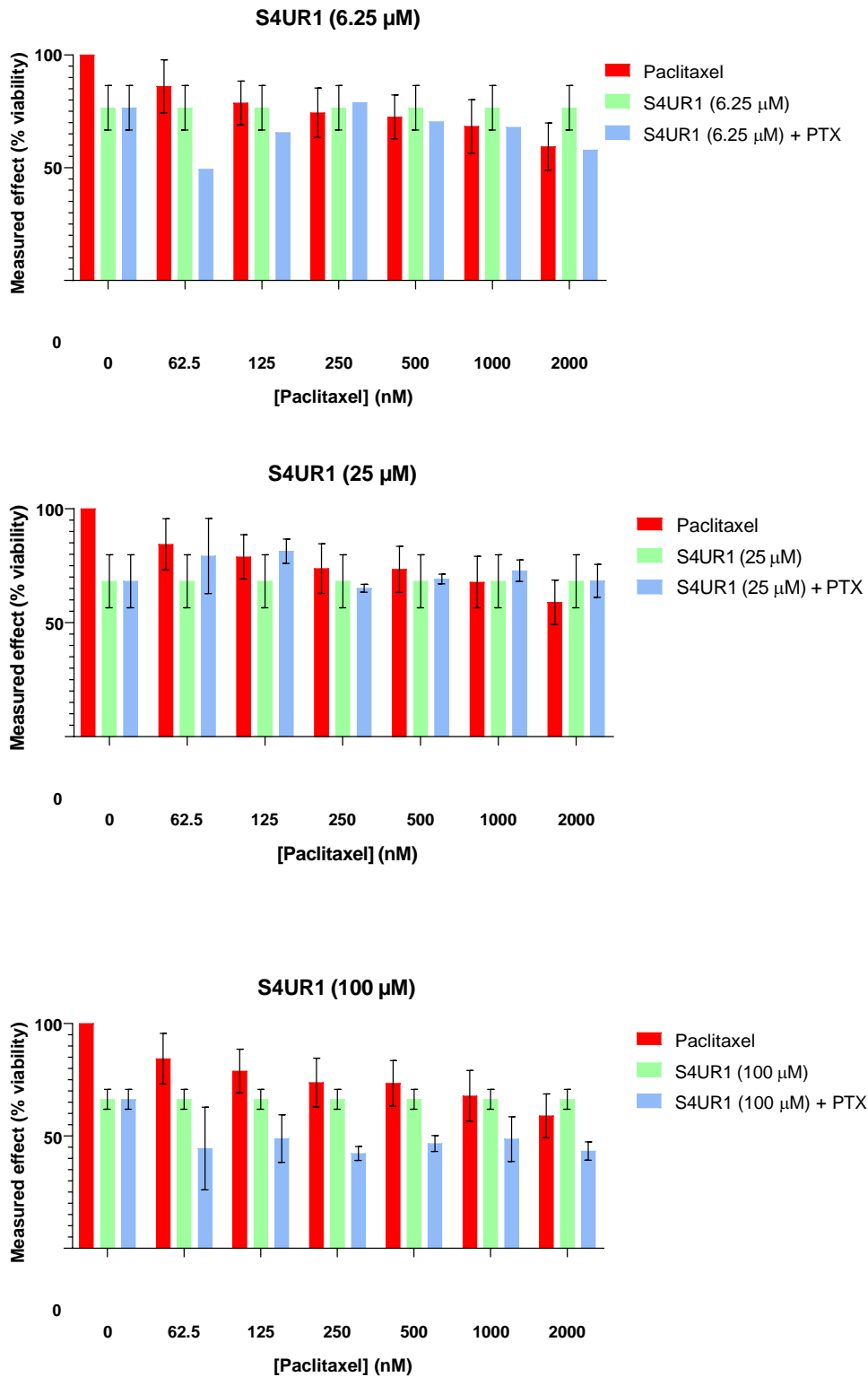


Figura 13 - Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da

mama (MCF-7), em concentrações fixas de 6,25 μM , 25 μM e 100 μM , variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM.

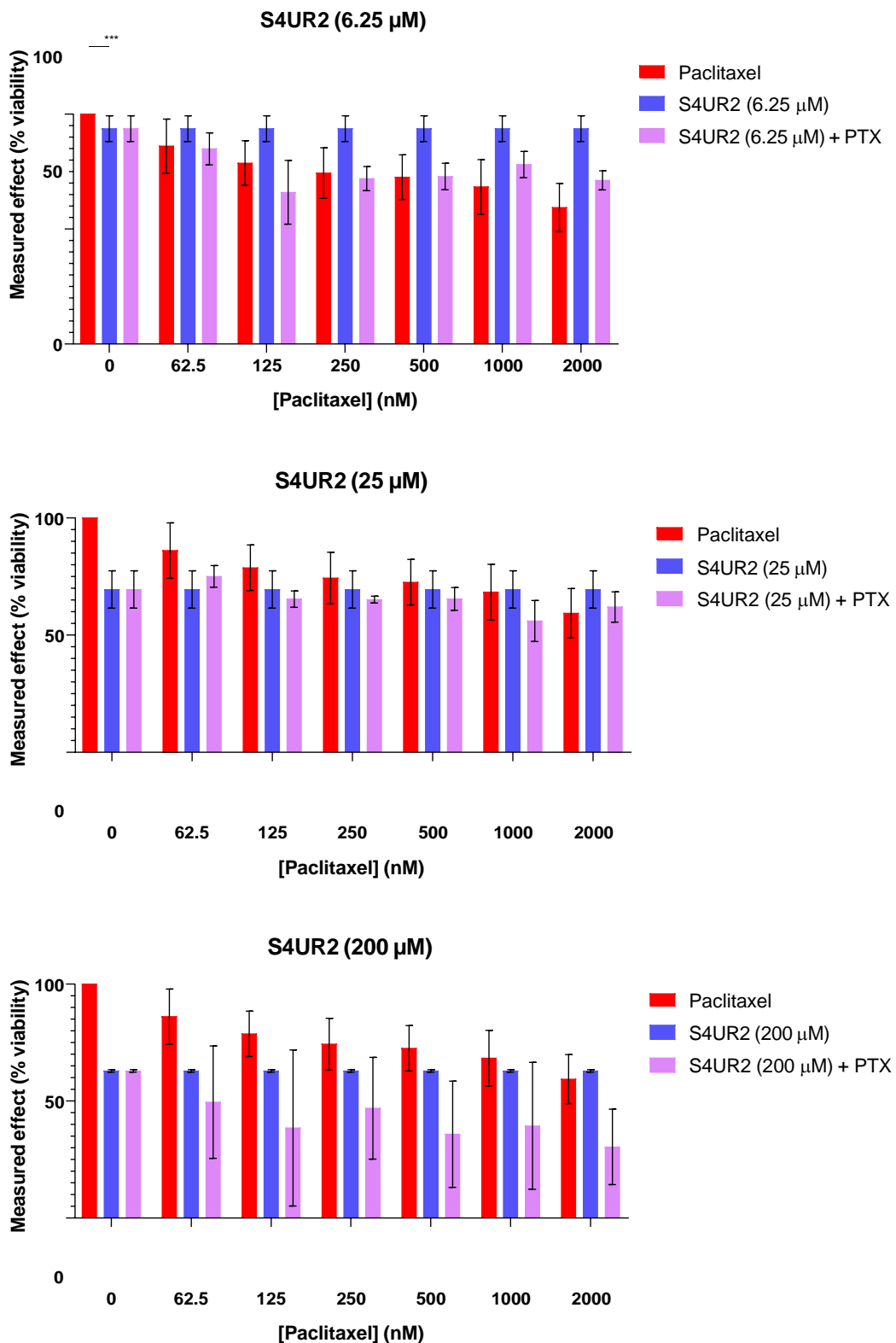


Figura 13 - Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7), em concentrações fixas de 6,25 μM, 25 μM e 200 μM, variando em todas o PTX em concentrações [0-2000] nM.

De seguida, são apresentados os dados dos ensaios de citotoxicidade, mas através uma leitura diferente.

Fizemos variar as concentrações da molécula R1 e R2 e fixamos o PTX.

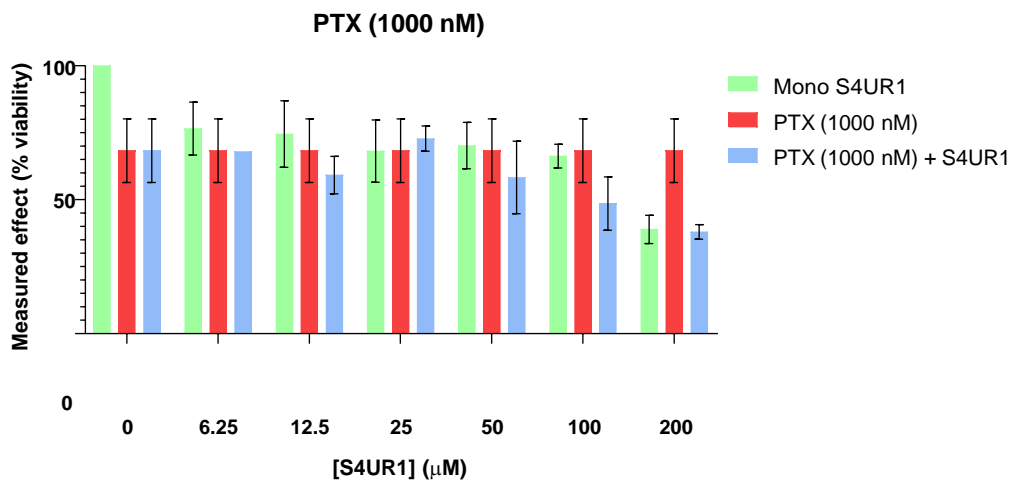
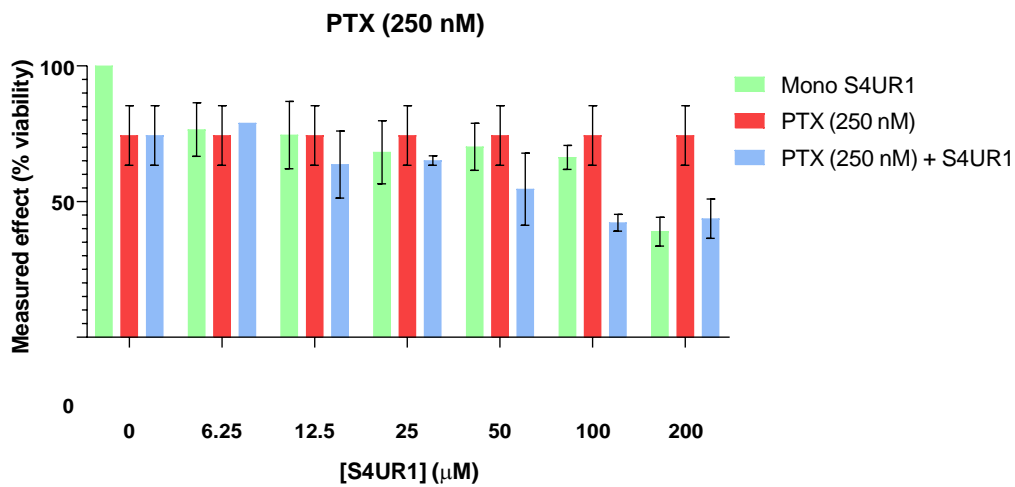
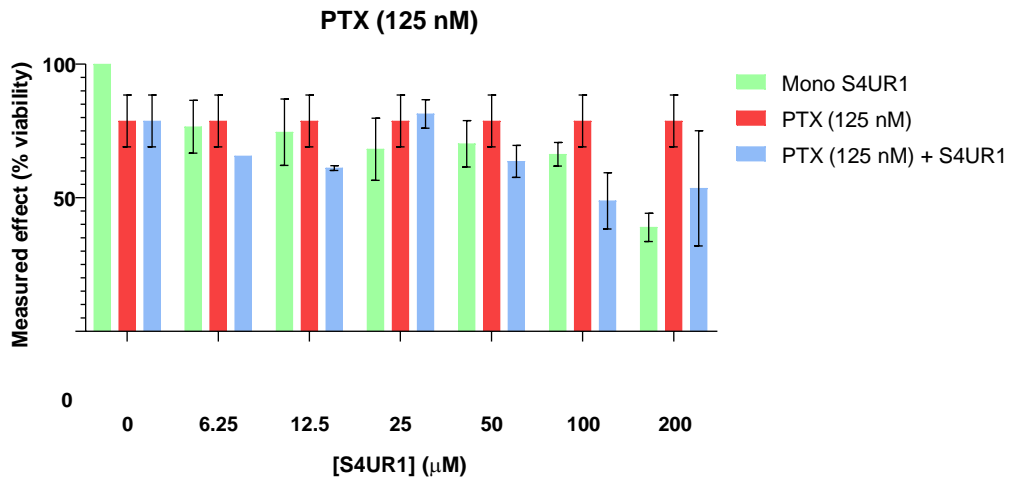


Figura 14 -Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR1 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 125 nM, 250 nM e 1000

nM, variando em todas a molécula S4UR1 em concentrações [0-200 μ M].

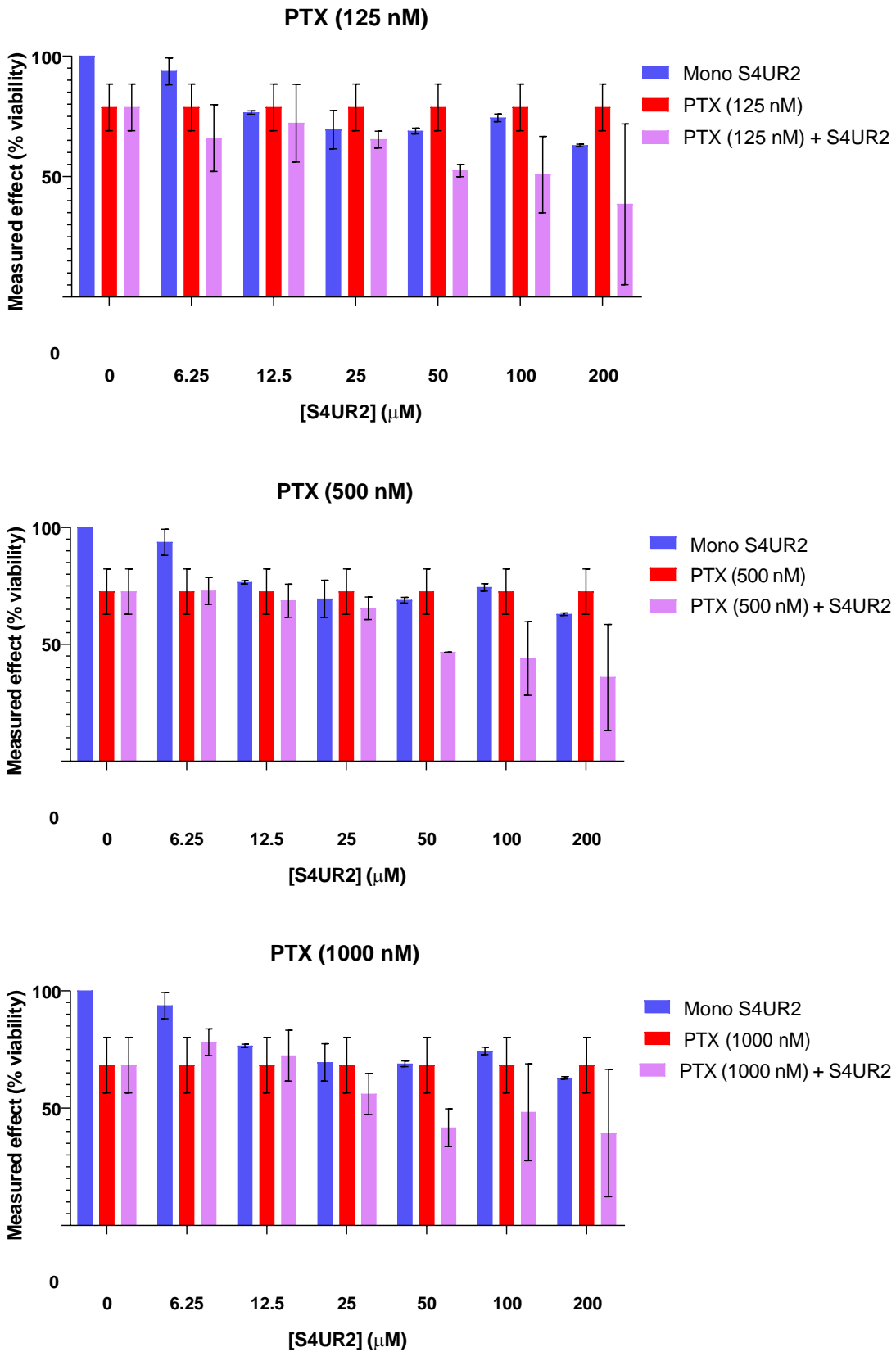


Figura 15- Efeito anticancerígeno combinado de PTX com S4UR2 na linha celular cancro da mama (MCF-7). As concentrações fixas de PTX em concentrações de 125 nM, 500 nM e 1000 nM, variando em todas a molécula S4UR2 em concentrações [0-200 µM].

Apesar dos gráficos dos modelos matemáticos apresentados no presente relatório, foram executados outros 3 modelos para cada molécula.

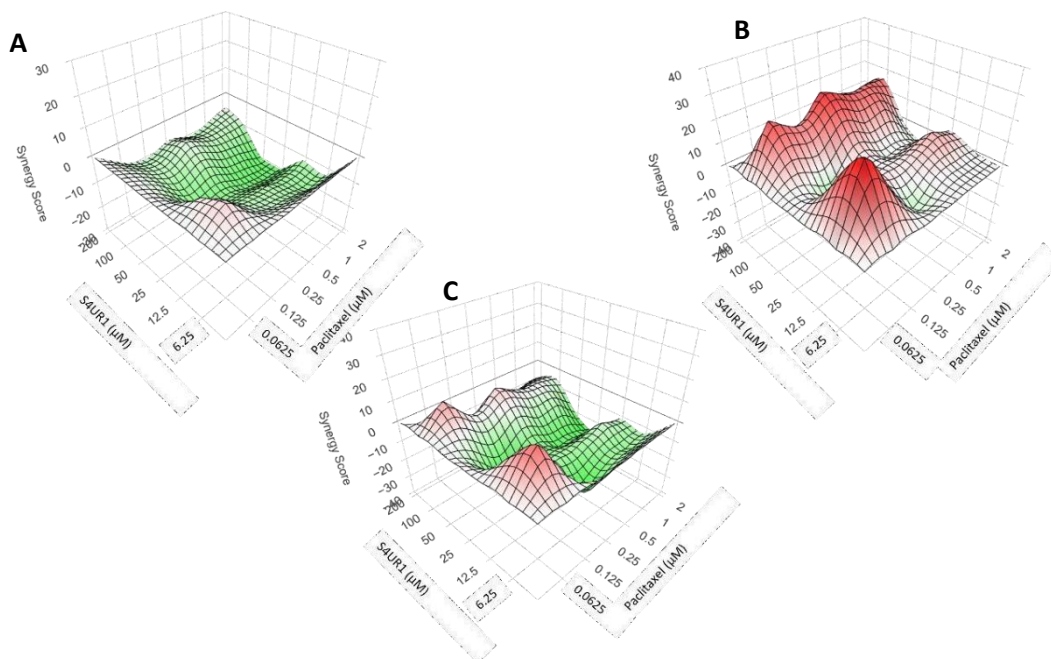


Figura 16- Gráficos de pontuação de sinergia da molécula S4UR1, realizados no software SynergyFinder, no modelo ZIP (A), HSA (B) e Bliss (C).

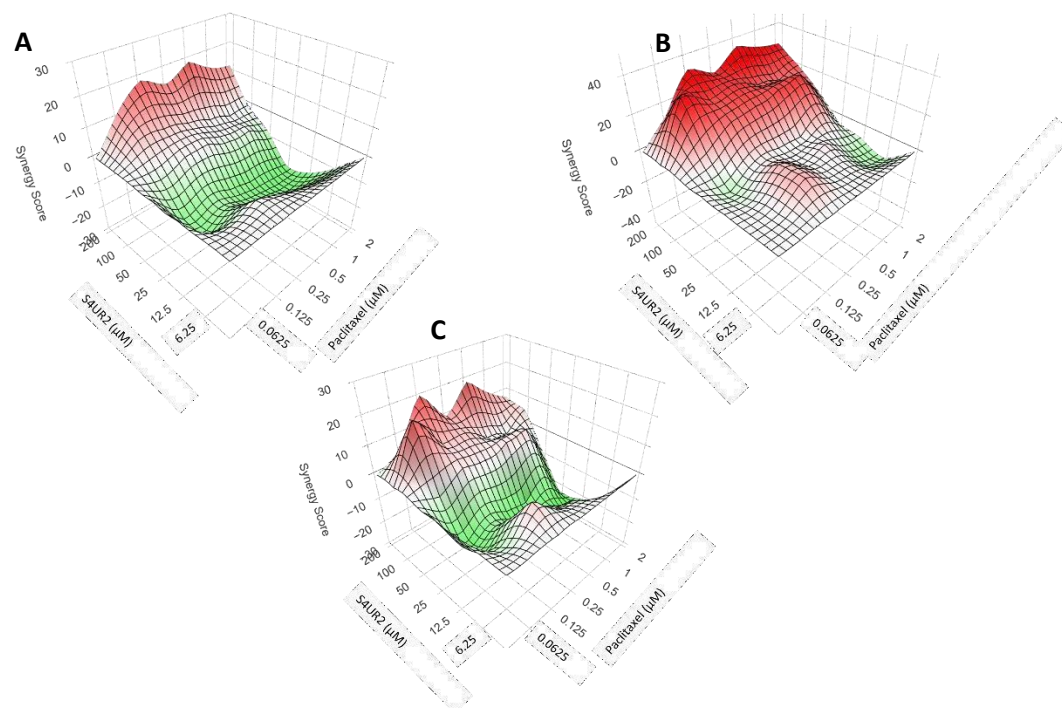


Figura 17 - Gráficos de pontuação de sinergia da molécula S4UR2, realizados no software SynergyFinder, no modelo ZIP (A), HSA (B) e Bliss (C).