UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Warne Pedro de Andrade

DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPERTERMIA EM MODELO *IN VITRO* DE HIPEC SOBRE AS LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO: IMPLICAÇÕES DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO E RESISTÊNCIA À PLATINA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Tocoginecologia: Área de Cancerologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Maria Silva Lopes

Botucatu
(2021)

Warne Pedro de Andrade

DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPERTERMIA EM MODELO *IN VITRO* DE HIPEC SOBRE AS LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO: IMPLICAÇÕES DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO E RESITÊNCIA À PLATINA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de doutor em Tocoginecologia: Área de Cancerologia

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Maria Silva Lopes

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Warne Pedro.
Determinação dos efeitos da hipertermia em modelo *in vitro* de HIPEC sobre as linhagens de células de câncer de ovário : implicações da expressão dos genes das proteínas do choque térmico e resistência à platina / Warne Pedro Andrade. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho
Coorientador: Luciana Maria Silva Lopes
Capes: 40101150

1. Ovários - Tumores. 2. Hipertermia. 3. Técnicas *in vitro*. 4. Proteínas de choque térmico. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: Câncer de ovário; HIPEC; Proteínas de choque térmico; Resistência à platina.

Dedicatória

À minha esposa **Tatiana Torres Lisboa de Andrade**, meus filhos **João Pedro** e **Amanda** pela compreensão das horas em que me fiz ausente e pelas palavras que me deram incentivo e perseverança para a conclusão dessa jornada. Agradeço por cada minuto ao lado de vocês. Do fundo do meu coração, obrigado por existirem na minha vida. Nosso lema continua “No final, tudo dá sempre certo¨. Minha eterna gratidão. Gratidão!!

Agradecimentos Especiais

À minha mãe **Maria José de Andrade** pelo início de toda a caminhada, obrigado pelo dom da vida e por tudo. GRATIDÃO!

Ao amigo professor **Agnaldo**, obrigado pela amizade e parceria. Você é simplesmente genial. Me desculpe por tantos questionamentos e mudanças de rotas. Você me fez entender que o simples é mais e no caos da pandemia temos que ter calma e perseverança. Estaremos sempre juntos. Gratidão!

Ao amigo de mais uma jornada juntos, **Gabriel Oliveira Bernardes Gil** pela amizade, parceria no dia a dia. Juntos somos mais fortes.!!! Amizade por resto da vida. Gratidão!!!!

Agradecimentos

Agradeço à Profª. Dra. **Luciana Maria Silva Lopes** e toda equipe da FUNED, pelo apoio logístico e pelo tempo dedicado à sua coorientação. Obrigado por ter acreditado no meu projeto, apoiar as minhas ideias. Você realmente e corajosa, forte e, ao mesmo tempo, ¨mãe inspiradora de ciência¨ no seu laboratório e na vida. Gratidão!!!

Ao **Bryan Ôrtero Perez Gonçalves** e **Iago Oliveira Peixoto** pelo apoio no laboratório, pelas aulas de pipetagem e pelo apoio técnico. Minha gratidão.

À **Renata Garcia Fernandino**, pelo apoio, inspiração e por ter me apresentado às proteínas do choque térmico.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, em especial à **Solange Sako Cagliari** por toda a dedicação. Você é nota 10!

Epígrafe

"A certidão de nascimento" do câncer é um papiro egípcio do século VII antes de Cristo em que um médico descreve uma "massa saliente no peito" para qual o tratamento não existia. No entanto, são raras as referências à doença antes do século XIX. O motivo é simples: As pessoas morriam de outros flagelos como tuberculose, cólera varíola, peste ou pneumonia. Nesse sentido, o câncer é uma moléstia da civilização moderna, não tanto pelos malefícios causados por ela, mas porque, com o prolongamento da vida humana, foi levado para o primeiro plano. Só na metade do século XX é que se intensificou a batalha épica da medicina contra um mal cuja a causa era desconhecida.

Texto do livro "O Imperador de todos os males" (Siddhata Mukherjee)
"Câncer: uma dialética da vida e da morte" (Warne Pedro de Andrade)

Resumo

Andrade, W.P. **DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA HIPERTERMIA EM MODELO *IN VITRO* DE HIPEC SOBRE AS LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO: IMPLICAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO E RESITÊNCIA À PLATINA**. 2021. 115 f, Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021

INTRODUÇÃO: O câncer epitelial de ovário (EOC) é a neoplasia maligna ginecológica mais letal, com a presença de quimiorresistência contribuindo para o pior prognóstico. Aproximadamente 80 por cento dos casos são diagnosticados no estágio III C e são tratados com cirurgia de citorredução seguida de quimioterapia adjuvante. No entanto, 70 por cento desses pacientes têm recorrências pélvicas e peritoneais. As Proteínas de Choque Térmico são produzidas em resposta ao estresse fisiopatológico e participam de diversos estágios da carcinogênese, atuando principalmente como agentes antiapoptóticos. Elas também estão implicadas na resistência à quimioterapia em vários tipos de tumores. Na tentativa de melhorar os resultados oncológicos, novas abordagens terapêuticas, como quimioterapia intraperitoneal e HIPEC, foram propostas em estudos recentes com ganhos na sobrevida global (SG). No entanto, algumas questões ainda não foram respondidas. **MÉTODO**: No estudo, culturas de células de câncer de ovário TOV-21G (carcinoma de células claras), SKOV-3 (carcinoma seroso resistente à platina) e OV-90 (seroso de alto grau) foram utilizadas. O ensaio de citotoxicidade celular (MTT) foi realizado. As linhagens de células de câncer de ovário foram tratadas com cisplatina em normotermia (37ºC) e cisplatina em hipertermia (41ºC) e um grupo controle tratado com solução salina PBS de 37 a 41ºC) por 24 horas, seguido por nova suplementação e uma nova incubação de três horas. Um ensaio clonogênico foi realizado. Em seguida, foram submetidos à extração de RNA e transcrição reversa. O qRT-PCR foi realizado para comparar a expressão de *TRAP1, HSPB1, HSPD1, HSPA1A* e *HSPA1L* em diferentes tratamentos. **RESULTADOS**: Não houve diferença significativa quanto à citotoxicidade no tratamento com cisplatina aquecida em relação ao tratamento com normotermia. Não foi possível avaliar a expressão gênica das proteínas de choque térmico na linhagem SKOV-3. Os genes *HSPB1, HSPD1* e *TRAP1* foram regulados positivamente em OV-90 submetido à hipertermia em relação à normotermia. Não houve alterações significativas na expressão gênica na linhagem TOV-21G. **CONCLUSÃO**: A linhagem

de células serosas de câncer de ovário OV-90, após tratamento com cisplatina aquecida, teve os genes de choque térmico *HSPA1A, TRAP1* e *HSPB1* regulados positivamente. O gene *HSPB1* apresentou a expressão de valor mais significativa. Nosso resultado mostrou que os genes do choque térmico podem estar relacionados à fenotipagem de resistência à quimioterapia encontrada neste tumor. O uso de everolimus tem o potencial de sensibilizar a citotoxicidade em um modelo usando cisplatina aquecida e melhorar resultados. Assim, é necessário avaliar esses genes em um estudo clínico de HIPEC.

Palavras-chave: câncer de ovário, resistência à platina, proteínas de choque térmico, HIPEC.

Abstract

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF HYPERTHERMIA IN A HIPEC *IN VITRO* MODEL ON OVARY CANCER CELL LINES: IMPLICATIONS OF HEAT SHOCK PROTEIN GENES EXPRESSION AND PLATINUM RESISTANCE

INTRODUCTION: Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecological malignancy, with the presence of chemoresistance contributing to the poor prognosis. Approximately 80% of cases are diagnosed in stage III C and are treated with cytoreduction surgery followed by adjuvant chemotherapy. However, 70 percent of these patients have pelvic and peritoneal recurrences. Heat Shock Proteins are produced in response to pathophysiological stress and take part in several stages of carcinogenesis, acting primarily as anti-apoptotic agents. They are also implicated in resistance to chemotherapy in several types of tumors. In an attempt to improve oncological results, new therapeutic approaches such as intraperitoneal chemotherapy and HIPEC have been proposed in recent studies with gains in overall survival (OS). However, some questions have not yet been answered. **METHODS**: In the study, cultures of ovarian cancer cells TOV-21G (clear cell carcinoma), SK-OV3 (platinum-resistant serous carcinoma), and OV-90 (high-grade serous). Cell cytotoxicity (MTT) assay was performed. The ovarian cancer cells lines were treated with cisplatin in normothermia (37 degrees Celsius) and cisplatin in hyperthermia (41 degrees Celsius) and a control group treated with PBS saline solution at (37 degrees Celsius and 41 degrees Celsius) for 24 hours, followed by new supplementation and a new three hours incubation. A clonogenic assay was performed. Then they were submitted to RNA extraction and reverse transcription. qRT-PCR was performed to compare the expression of *TRAP1, HSPB1, HSPD1, HSPA1A and HSPA1L* in different treatments. **RESULTS**: There was no statistical difference concerning cytotoxicity between treatment with heated cisplatin and treatment with normothermia. It was not possible to evaluate the expression of the heat shock genes in the SKOV-3 lineage. The *HSPB1, HSPD1 and TRAP1* genes were positively regulated in OV-90 submitted to hyperthermia in relation to normothermia, and there were no significant changes in expression in the TOV-21G. **CONCLUSION**: In conclusion, we observed that OV-90 serous ovarian cancer cell line, after heated cisplatin treated had the *HSPA1A*, *TRAP1,* and *HSPB1* heat shock genes upregulated. The *HSPB1* genes had the most significant value expression. Our result showed that the heat shock genes can be related at chemotherapy resistance phenotyping founded this tumor-like. The use of everolumus

has the potential to sensitize cytotoxicity in a model using heated cisplatin and improved results Thus, it is necessary to evaluate these genes in a clinical study of HIPEC.

Keywords: ovarian cancer, resistance to chemotherapy, heat shock proteins, HIPEC.

Índice

1. INTRODUÇÃO 19
1.1 Câncer 20
1.2 Câncer Epitelial de Ovário (CEO) 22
1.3 Câncer de ovário e a carcinomatose peritoneal 25
1.4 Tratamento do câncer de ovário 28
1.5 Cisplatina 29
1.5.1 *Mecanismos de resistência tumoral à cisplatina* 31
1.5.1.1 Influxo/efluxo de cisplatina 31
1.5.1.2 Detoxificação 32
1.5.1.3 Reparo a danos no DNA 32
1.5.1.4 Sinalização da apoptose 33
1.6 Quimioterapia intraperitoneal (QT IP) 33
1.7 HIPEC (Quimioterapia Hipertérmica Intraperitoneal) como modalidade de tratamento na doença peritoneal 34
1.8 O papel das Proteínas de Choque Térmico na carcinogênese 37
1.8.1 *Proteínas de choque térmico e câncer de ovário: relação com prognóstico e resistência ao tratamento* 40
1.9 Everolimus: inibidor da via do m-TOR 44

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO 46

3. OBJETIVOS 49
3.1 Objetivo Geral 50
3.2 Objetivos Específicos 50

4. METODOLOGIA 51
4.1 Cultivo celular 52
4.2 Ensaio de citotoxicidade celular 52
4.2.1 Análise de solubilização de everolimus e sobrevivência celular em diferentes concentrações de everolimus (ensaio de MTT) 53
4.3 Ensaio clonogênico 53
4.4 Extração e qualificação do RNA total 54

4.5 Avaliação da integridade do RNA 55
4.6 Tratamento do RNA com DNAse 55
4.7 Síntese do DNA complementar (cDNA) 56
4.8 Avaliação da expressão dos transcritos 56

5. RESULTADOS 58
5.1 Análise estrutural das linhagens expostas aos tratamentos 59
5.2 Cálculo das expressões gênicas 62
5.3 Análise *in silico* da rede de interação dos genes 62

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

7. ARTIGO 74

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 104

9. ANEXOS 106

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer engloba um grande grupo de doenças que são caracterizadas por crescimento anormal das células e sua propagação, a partir do local de origem, é conhecido como metástase. Sendo entendido como uma doença do genoma, que surge pelo acúmulo de mutações genéticas e modificações epigenéticas que perturbam a função normal das vias de sinalização responsáveis pela coordenação da morte celular, diferenciação e proliferação celular.[1]

O desenvolvimento do câncer se inicia pelas mutações que são modificações na sequência do DNA capazes de alterar a expressão gênica, tais como alterações nas sequências de nucleotídeos dentro de regiões promotoras ou codificadoras de um gene. As mutações podem ser introduzidas no DNA pela exposição à cancerígenos ambientais, tanto exógenos como endógenos, ou pela replicação e reparação intrínseca do DNA sujeito a erros na própria maquinaria celular.[2] A mutação genética é o fator mais relevante para a formação do câncer, pois podem ocorrer mutações em genes *drivers,* isto é, genes que quando mutados, podem promover a tumorigênese levando à formação do câncer.[3] Todavia é importante ressaltar que algumas das alterações no DNA que predispõem ao câncer são herdadas (5-10% dos casos). No entanto, a grande maioria (90-95%) dos casos é induzida por exposições a fatores externos, tais como xenobióticos (tabaco, álcool, pesticidas), organismos infecciosos (vírus da hepatite B e C, vírus HTLV1 e HTLV2) e alimentação inadequada.[4]

A perda de estabilidade do genoma é uma característica relevante relacionada à progressão do tumor, em que elevadas taxas de mutação somadas a alterações cromossômicas, tanto numéricas quanto estruturais e ativação de vias específicas, se combinam para conduzir à proliferação celular sem nenhum controle e resistência à morte celular. Estes fatores são cada vez mais estudados em oncologia, visto que a instabilidade genômica está associada à resposta ao tratamento com imunoterapia.[5] É importante ressaltar que outros fatores também são essenciais ao desenvolvimento do câncer, como a reprogramação do metabolismo energético, estímulo à angiogênese e evasão à destruição imune, construindo então o “microambiente do tumor"[9], atualmente conhecidos como “hallmarkers” do câncer.[6]

Segundo o GLOBOCAN, foram estimados para 2020 aproximadamente 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer em todo mundo (Figura1).[7] São estimados, para o ano 2030, 20 milhões de casos incidentes e 13 milhões de mortes, indicando um acentuado aumento tanto em número de novos casos quanto em mortalidade provocadas pelo câncer (WORLD CANCER REPORT, WHO, 2014).[8]

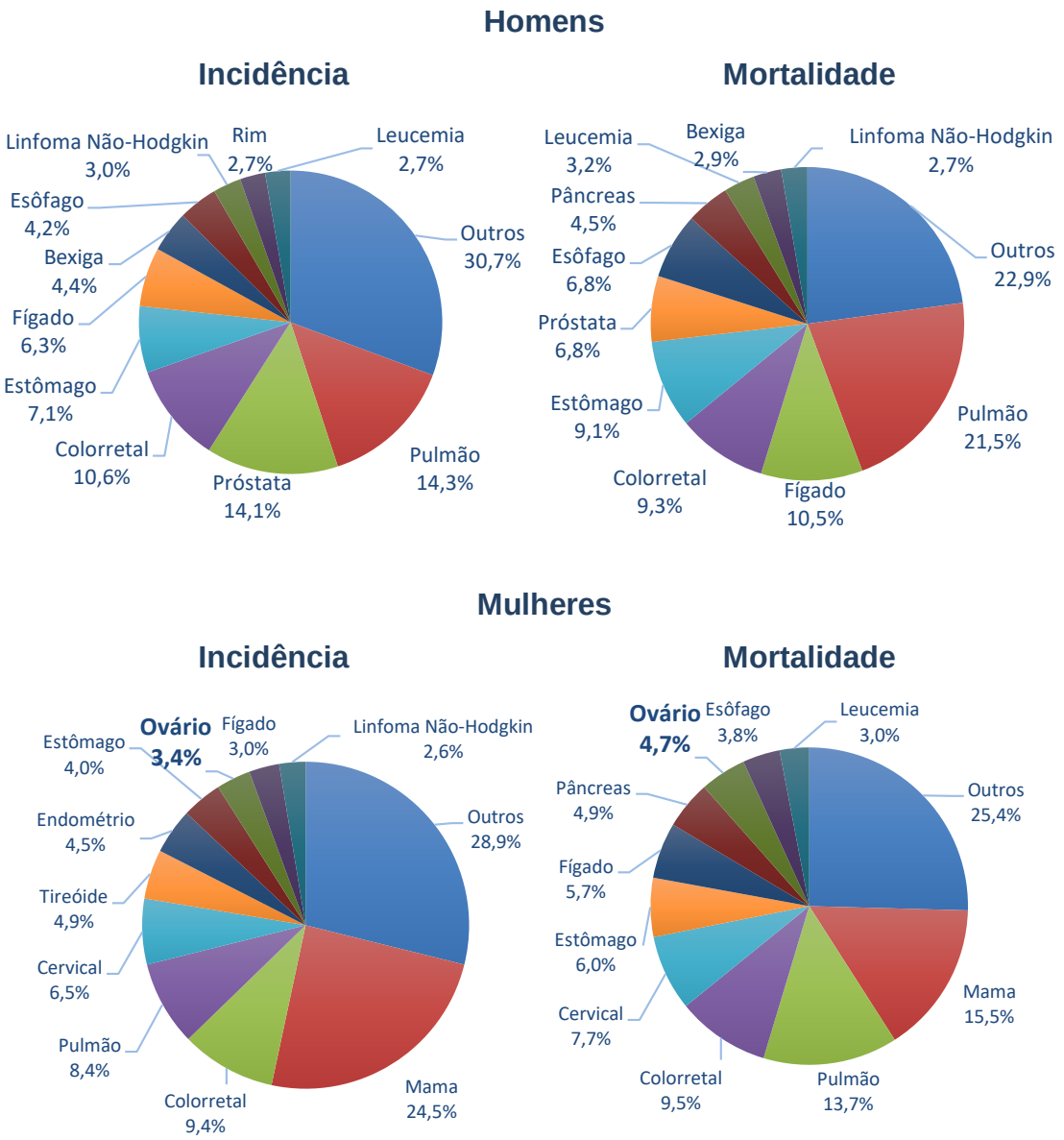
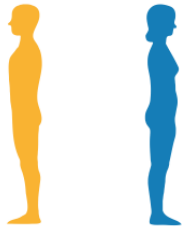


FIGURA 1. Distribuição de casos e mortes por área mundial, em 2020, para homens e mulheres.
Fonte: Adaptado GLOBOCAN, 2020

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)[9], a estimativa no biênio 2020-2021 para o Brasil aponta a ocorrência de cerca de 625 mil casos novos de câncer. Entre os dez tipos de câncer com maior incidência, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens foram próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Em mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) foram os mais incidentes (INCA, 2020) (Figura 2).[9]

Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%
Cólon e reto	20.520	9,1%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%
Estômago	13.360	5,9%
Cavidade oral	11.180	5,0%
Esôfago	8.690	3,9%
Bexiga	7.590	3,4%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%
Laringe	6.470	2,9%
Leucemias	5.920	2,6%



Localização Primária	Casos	%
Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.470	9,2%
Colo do útero	16.590	7,4%
Traqueia,brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Glândula tireoide	11.950	5,4%
Estômago	7.870	3,5%
Ovário	6.650	3,0%
Corpo do útero	6.540	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2021, por sexo, exceto pele não melanoma*.
Fonte: INCA, 2020.

1.2- Câncer Epitelial de Ovário (CEO)

CEO é o sexto tumor mais frequente e a quinta causa de morte por câncer, em mulheres, nos Estados Unidos.[10] No Brasil, segundo dados do INCA, são esperados 6.650 casos novos de câncer de ovário para o triênio 2020-2022, sendo que este valor corresponde a um risco estimado de 6,18 casos novos a cada 100.000 mulheres.[9] A média de idade ao diagnóstico é 63 anos, sendo que 70% das pacientes já são diagnosticadas em estadio avançado.[11] Sendo assim, o CEO é considerado o mais letal dos tumores ginecológicos, embora seja considerado uma neoplasia de baixa incidência quando comparados com outros tipos de câncer, como de câncer de mama e o de colo de útero.Este achado se deve ao seu caráter insidioso.[11]

Estudos recentes, tem demonstrado que o CEO não é uma doença isolada, mas é composto por um grupo heterogêneo de tumores que podem ser classificados com base nas características morfológicas e moleculares distintas e possuem origens diferentes.[12]

Em função dos tipos celulares que constituem os ovários, podem ser

originados diferentes tipos de tumores, que são agrupados em: (i) tumores de células germinativas, (ii) tumores de células do estroma e (iii) tumores epiteliais.[12] Os tumores de células germinativas (i) são derivados das células germinativas primordiais. Estes tumores constituem aproximadamente 25% de todos os tumores ovarianos, mas apenas 2-3% das neoplasias ovarianas malignas.[13] Tumores do estroma ovariano (ii) são uma rara classe de malignidades, representando aproximadamente 7% dos casos, e se desenvolvem a partir de células do tecido conjuntivo que tem como função a sustentação do tecido ovariano e a produção dos hormônios femininos, estrogênio e progesterona.[14] Os tumores epiteliais (iii) são importados principalmente do epitélio do tubo endometrial ou do tubo de falópio, sendo que o paradigma prevalece na gênese do carcinoma seroso de alto grau (HGSC) que corresponde ao câncer de ovário mais comum.[15]

Em 2010, considerando uma série de estudos morfológicos e genéticos, Kurman & Shih (2010) propuseram a categorização do CEO em dois grupos designados tipo I e tipo II. Os CEO classificados como tipo I são tumores indolentes, composto por carcinomas de baixo grau, progressão lenta e apresentam-se frequentemente em estágio precoce. Entre os carcinomas do tipo I incluem, células claras, endometrióide, mucinosos e carcinomas serosos de baixo grau. Além disso, os carcinomas exibem uma linhagem compartilhada com a neoplasia cística benigna. Estes tumores se comportam realmente de forma menos agressiva, são confinados ao ovário na apresentação.[16] Em contraste, os tumores do tipo II, apresentam normalmente estágios avançados, sendo tumores de alto grau altamente agressivos e são diagnosticados como carcinomas epiteliais serosos de alto grau e tumores mesodérmicos mistos malignos (carcinossarcoma), dependendo do padrão dominante.[16]

Os tumores do tipo I apresentam mutações específicas nos genes *KRAS*, *BRAF* e *ERBB2*, sendo tais mutações frequentes em aproximadamente dois terços dos carcinomas serosos de baixo grau. As mutações *TP53* são raras em tumores do tipo I. Carcinomas serosos de alto grau, tumor clássico do tipo II, caracterizam-se por uma alta frequência de mutações em *TP53* (> 80% dos casos), amplificação em *CCNE1* e raramente apresentam mutações que caracterizam a maioria dos tumores do tipo I como *KRAS, BRAF, ERBB2, PTEN, CTNNB1* e *PIK3CA7.* Os carcinomas mucinosos apresentam mutações *KRAS* em mais de 50% dos casos, enquanto que em carcinoma de células claras, mutações em *PIK3CA* são bastante frequentes.[16] A

figura abaixo mostra as principais alterações genéticas encontradas nos tumores do tipo I e do tipo II.

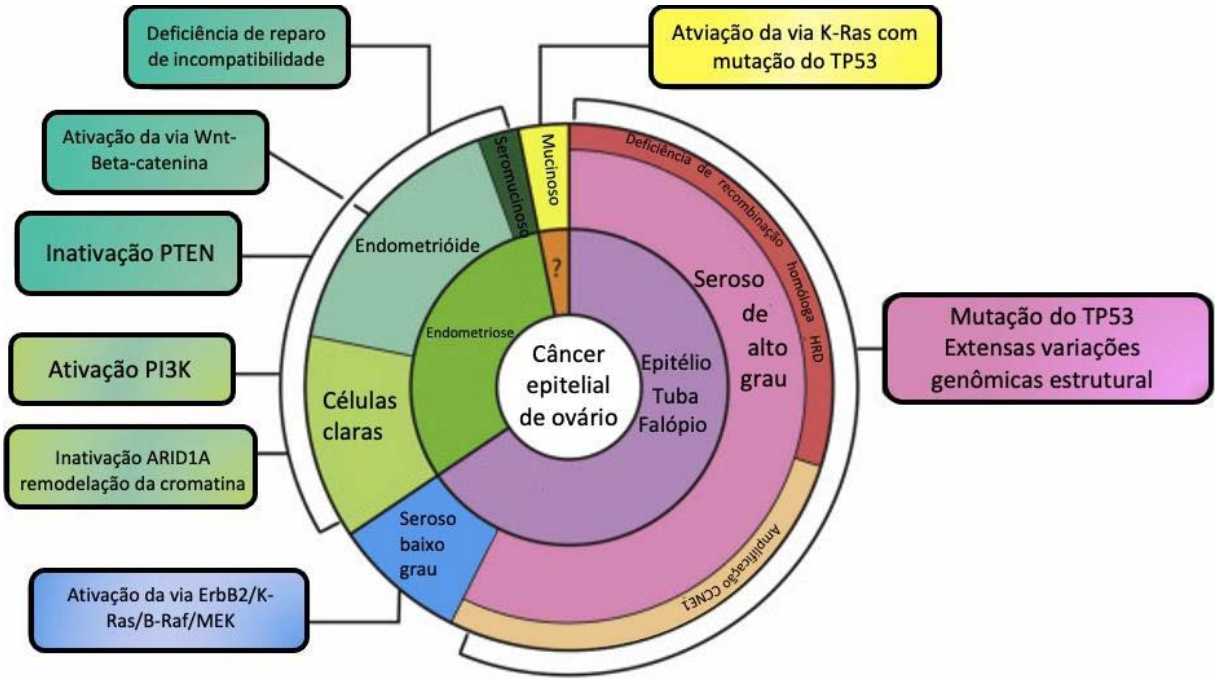


FIGURA 3. As origens do tecido e as principais alterações das vias moleculares em diferentes tipos de câncer epitelial ovariano.
Fonte: Adaptado Ie-Ming Shih, 2020.

Do ponto de vista da hereditariedade, cerca 10 a 15% dos casos de CEO são hereditários. Sendo 90% desses casos relacionados a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.[17] As células deficientes em *BRCA1/2* demonstram comprometimento do mecanismo reparo de DNA por recombinação homóloga.[16] Este fato justifica a realização de teste para avaliação de mutação nestes genes em todas as pacientes com neoplasia de ovário. É importante ressaltar que o conhecimento desta mutação ao diagnóstico nos fornece informação prognóstica e preditiva de resposta ao tratamento, pois em caso de mutação no gene *BRCA* já temos disponíveis na nossa prática clínica, dois inibidores da enzima PARP (Olaparibe & Niraparibe).[18] As pacientes que apresentam mutações em *BRCA1* e *BRCA2* têm risco relativo de desenvolver câncer de ovário 40 vezes maior do que o restante da população.[18]

Diversos fatores, além do envelhecimento e da hereditariedade, têm sido relacionados ao CEO. Dentre os fatores de risco não genéticos conhecidos para CEO temos: aumento da idade, nuliparidade, terapia hormonal pós-menopausa e obesidade. O uso prolongado de anticoncepcionais orais reduz o risco de CEO em aproximadamente 50% em portadores de mutação *BRCA1/2.*[18] Vale relatar que várias outras mutações em genes como *KRAS, RB1, PTEN* e *PIK3CA* podem estar

associadas e combinadas de maneiras distintas em diferentes casos de CEO.[19]

Atualmente, as abordagens diagnósticas para investigação dessa doença na prática clínica envolvem o exame pélvico, ultrassonografia, tomografia de abdome e pelve, além da quantificação dos níveis séricos de CA-125.[20] Entretanto, o diagnóstico definitivo é confirmado apenas após cirurgia e exame histopatológico. É importante ressaltar que a dosagem do CA-125 não deve ser vista como um marcador diagnóstico, pois pode estar aumentado em outras condições neoplásicas e não neoplásicas.[20]

O estadiamento da doença é feito de acordo com as recomendações da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). Os tumores de células claras (tipo I) são aqueles com maior resistência à quimioterapia, muito embora os tumores mucinosos também apresentem menor taxa de resposta a regimes contendo platinas, em comparação a tumores papilíferos.[21]

Os fatores prognósticos definidos pela correlação com a sobrevida, em geral refletem o estadiamento da doença ao diagnóstico, o tipo e o grau histológico e à performance *status* (PS) da paciente.[22] Em relação ao estadiamento, a sobrevida em cinco anos é de cerca de 95% para os casos de tumores localizados no ovário, 70% para os casos com implantação regional e, de aproximadamente 30%, para os tumores disseminados. No entanto, no momento do diagnóstico, cerca de 20% dos casos apresentam-se localizados e aproximadamente 70% com disseminação à distância.[22] Além destes fatores pré-tratamento, outros que podem ter impacto prognóstico incluem o tipo de tratamento recebido (qualidade da citorredução, agentes utilizados na quimioterapia) e a taxa de resposta ao tratamento, além da toxicidade induzida por este.[22,23,24]

1.3 Câncer de ovário e a carcinomatose peritoneal

Aproximadamente 60 a 80% das pacientes com CEO são diagnosticadas com doença já fora do ovário, sendo o peritônio o local mais comum.[24] Estas pacientes possuem estadio III C e são tratadas com protocolos de citorredução seguidos de quimioterapia adjuvante com os fármacos cisplatina e paclitaxel. Sendo o objetivo da citorredução remover o máximo possível de lesões tumorais e quanto menor o volume tumoral residual após a cirurgia, melhores são os resultados. Todavia, para um melhor entendimento da distribuição da doença dentro do peritônio, a cavidade abdominal foi

dividida em 13 regiões, onde cada região recebe uma pontuação de 0-3 (índice de tamanho tumoral), dependendo do volume de implantes tumorais encontrados em cada uma destas regiões, ao final, obtém-se o índice de carcinomatose peritoneal (ICP)[25]. O ICP pode variar de 0-39 e é utilizado, principalmente, para quantificar o volume de doença peritoneal e estimar a possibilidade de citorredução (Figuras 4, 5, 6 e 7). As regiões no abdome são divididas, jejuno proximal, jejuno distal, íleo distal. Em central, hipocôndrio direito, epigástrio, hipocôndrio esquerdo, franco esquerdo, fossa ilíaca esquerda, pelve, fossa ilíaca direita, franco direito, jejuno proximal, jejuno distal, íleo proximal, íleo distal. O índice tamanho tumoral é classificado como LS (*lesion size* = tamanho da lesão) 0 - quando não há lesão; LS1 - quando existe nódulos até 0,5 cm; LS2 - quando existe nódulos 0,5 – 5,0 cm e LS3 - na presença de nódulos maiores que 5,0 cm ou confluente, conforme a Figura 3. O ICP pode variar 0-39 e é utilizado principalmente para quantificar o volume de doença peritoneal e estimar a possibilidade de citorredução nos pacientes com metástase peritoneal.[26]

Outro índice utilizado é o Índice de citorredução (IC) para mensurar a doença residual na cavidade abdominal após a cirurgia de citorredução e possui valor prognóstico. O índice varia de 0-3 conforme o volume de doença residual após a citorredução, onde 0 significa ausência de doença residual; IC1 - doença residual até 2,5 mm, IC2 - doença residual entre 0,25 - 2,5 cm e IC3 -doença residual maior que 2,5 cm. Entende-se como citorredução completa as ressecções IC0. O IC é fundamental para os pacientes candidatos a HIPEC.(Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica).[27]

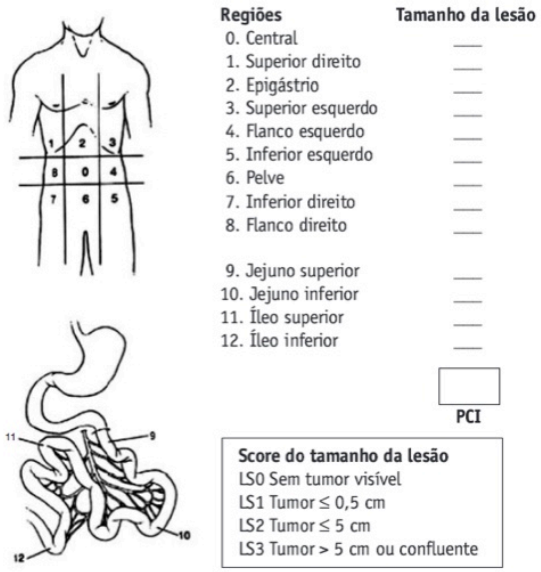


FIGURA 4. Índice de carcinomatose peritoneal (ICP). Fonte: Sugarbaker, 1995

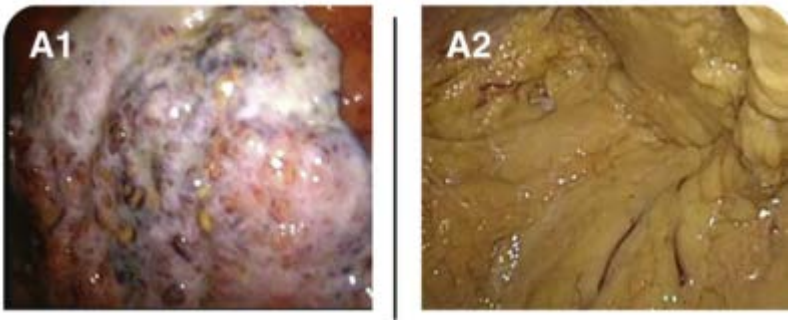


FIGURA 5. Carcinomatose peritoneal envolvendo omento.
Fonte: Agnaldo Lopes da Silva Filho (2018).

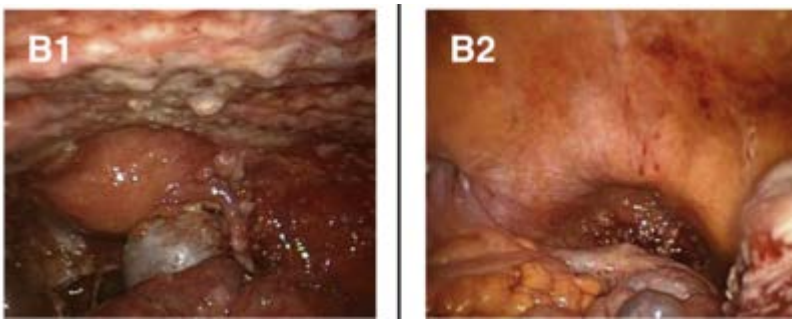


FIGURA 6. Carcinomatose peritoneal.
Fonte: Agnaldo Lopes da Silva Filho (2018).

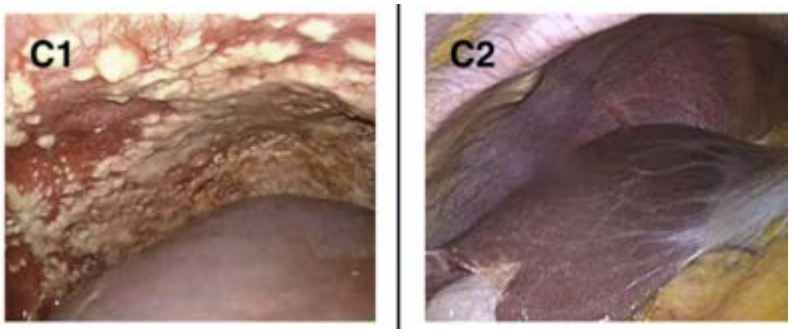


FIGURA 7. Carcinomatose envolvendo o diafragma.
Fonte: Agnaldo Lopes da Silva Filho (2018).

Nos últimos 10 anos, a quimioterapia neoadjuvante se tornou uma das abordagens mais aceitas no tratamento da neoplasia de ovário EC III e IV. Após realização de estudo fase III, benefícios semelhantes em termos sobrevida global quando comparados com a cirurgia primária, seguido de quimioterapia adjuvante foram verificados. Contudo, as pacientes que atingiram respostas completas apresentaram recidivas preferencialmente no peritônio em cinco anos. Estas pacientes passam a ter um prognóstico ruim e tornam se um grande desafio na prática

clínica, visto o contexto de alta morbidade e mortalidade da carcinomatose peritoneal. Além disso, existe uma relativa resistência à quimioterapia sistêmica.[28] Logo, neste cenário, a terapia de HIPEC e quimioterapia IP (quimioterapia Intraperitoneal normotérmica) aparecem como mais uma arma no arsenal de tratamento desta neoplasia, principalmente levando em consideração a carcinomatose peritoneal e serão descritas nesta tese.

1.4 Tratamento do câncer de ovário

No que diz respeito ao impacto do tratamento das pacientes com CO, há diferença de sobrevida quando se compara pacientes tratadas por ginecologistas com formação em oncologia e aquelas tratadas por cirurgiões gerais.[22] Assim, a ressecção cirúrgica máxima representa a principal etapa no tratamento do CO, sendo importante, em termos prognósticos, mesmo em pacientes com doença comprometendo o peritônio.[22]

Como descrito acima, a maior parte das pacientes com CEO são diagnosticadas com doença localmente avançada ou metastática (estadiamento III e IV, segundo a classificação da FIGO). Assim, mesmo que a cirurgia citorredutora seja um componente fundamental para o tratamento inicial, a maioria das pacientes não pode ser curada com esta modalidade isoladamente, em decorrência de implantes peritoneais residuais micro ou macroscópicos ou metástases à distância.[21]

Sendo o CEO extremamente sensível à quimioterapia, numerosos agentes antiblásticos são utilizados de forma adjuvante e proporcionam respostas objetivas. Desta forma, a quimioterapia resulta em respostas clínicas completas na maioria das pacientes com doença localmente avançada (aproximadamente 75% dos casos).[11]

Os derivados de platina representam atualmente o eixo da quimioterapia do CEO. Os estudos iniciais empregaram cisplatina em combinação com ciclofosfamida e esta combinação se tornou o padrão para estudos subsequentes, até que um estudo do GOG (Grupo de Ginecologia Oncológica) mostrou que a combinação de cisplatina e paclitaxel era superior, tanto em sobrevida livre de progressão (SLP) quanto em sobrevida global (SG).[29]

Atualmente, a combinação de carboplatina e paclitaxel é considerada a combinação padrão ouro, após os resultados de dois estudos de não-inferioridade, que demonstraram que a carboplatina tem um perfil de toxicidade mais favorável que

a cisplatina com uma eficácia equivalente à esta última.[30] De fato, a SLP varia de 16 a 21 meses e a SG de 24 a 60 meses, dependendo do volume de doença ao início da quimioterapia.[31,32]

Novos tratamentos farmacológicos também foram incorporados para o tratamento CEO recidivado e para o tratamento adjuvante em caráter de manutenção. Agentes direcionados à angiogênese como o anticorpo monoclonal, o bevacizumabe, que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular humano (VEGF) e inibe sua atividade. Também existe novas estratégias de tratamento como os inibidores da PARP, que tornam as enzimas PARP incapazes de realizar o reparo do DNA e conduzem a célula à letalidade sintética.[33]

1.5 Cisplatina

A cisplatina será mais especificamente discutida, pois é a droga utilizada nos principais protocolos de HIPEC, quimioterapia intraperitoneal e foi o medicamento utilizado nos ensaios conduzidos nesta tese. As propriedades da cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II), cis[Pt (NH_3)$_2$$Cl_2$] foram descritas no final da década de 60, por Barnet Rosemberg, que estudava o efeito de campo elétrico em uma colônia de bactérias *Escherichia coli* em crescimento.[35] Durante os estudos, foi observado que as bactérias formavam filamentos alongados pois não conseguiam se dividir. A partir deste achado, estudos foram realizados visando compreender a causa desde fato. Foi demonstrado que a platina do eletrodo usado no ensaio se dissolvia no meio de cultura que continha sais de amônio, formando espécies complexas de metal, onde ocorria uma reação fotoquímica de troca do ligante Cl- por NH_3 na estrutura da platina e este composto formado inibia a divisão celular.[35]

O mecanismo de ação da platina tem como alvo o DNA, ligando-se a um dos átomos de nitrogênio das bases de guanina ou adenina através de uma ligação covalente. Podem ocorrer quatro tipos de ligações diferentes da platina ao DNA. O átomo de platina faz uma ligação com o DNA (aduto monofuncional), o átomo de platina se liga a duas posições no DNA, chamado adutos bifuncionais: na mesma fita (intrafita), em fitas diferentes (interfita) e ainda pode ocorrer a ligação da platina ao DNA e a histona simultaneamente (intermolecular).[35] A ligação da platina ao DNA distorce sua estrutura e interfere no processo de replicação e transcrição, levando a célula à morte, conforme esquema do mecanismo de ação da cisplatina na Figura 8.[35]

A cisplatina possui baixa solubilidade em água e a absorção sistêmica é rápida por via endovenosa (EV) e intraperitoneal (IP). A cisplatina é estável por 24 horas em temperatura ambiente e perde sua estabilidade físico-química em temperaturas superiores a 35ºC.[35]

Os principais efeitos colaterais relacionados ao tratamento com cisplatina são náuseas e vômitos de forte intensidade, nefrotoxicidade, mielossupressão, ototoxicidade, alopécia, azoospermia e esterilidade.[35]

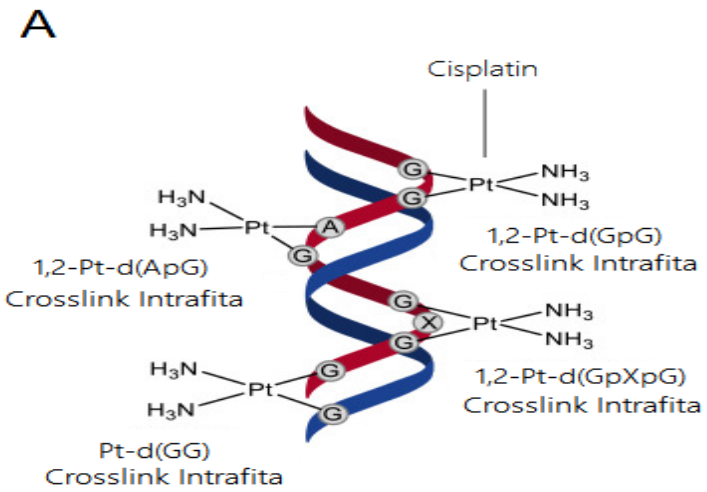


FIGURA 8. Mecanismo de ação da cisplatina e paclitaxel. A) A cisplatina forma adutos no DNA sendo o crosslink mais abundante o do tipo 1,2-Pt-d (GpG).
Fonte: Adaptado de WANG & ZHU (2018).

No entanto, a despeito do número expressivo de pacientes que respondem ao tratamento inicial, a maioria delas sofrerá uma recaída dentro de dois anos com resistência à platina. A sobrevida média após a recidiva é de aproximadamente dois anos.[36] Assim, um problema considerável no tratamento do CO é avaliação prognóstica das pacientes e condução das pacientes que recaem após quimioterapia baseada em platina. Tumores que responderam a um esquema baseado em platina, podem voltar a fazê-lo em um segundo ou terceiro tratamento, reutilizando a platina.[37] A probabilidade de resposta é intimamente relacionada ao intervalo livre de tratamento (tempo decorrido entre a realização da quimioterapia e a documentação da progressão da doença). Desta forma, as pacientes são classificadas em platino sensíveis (intervalo > 6 meses) ou platino resistentes (intervalo < 6 meses).[36]

Após a exposição das células à cisplatina e consequente interação da droga com o DNA, diversas vias de sinalização podem ser desencadeadas como resposta ao dano. A pausa da célula nos pontos de checagem do ciclo celular pode ser desencadeada normalmente para tentativa de reparo do DNA, mas caso a extensão dos danos seja muito grave a célula ativa as vias de apoptose, levando à morte celular.[35] A ativação da apoptose se dá por intermédio da proteína supressora de tumor p53, que por sua vez é ativada por proteínas quinases, em resposta aos danos causados pela cisplatina. Além disso, a cisplatina pode levar à morte celular por aumentar o estresse oxidativo ou desregular a homeostase do cálcio.[35]

Contudo, a resistência das células tumorais à cisplatina se apresenta como um efeito recorrente no tratamento contra diversos tipos de câncer.[37] A resistência pode ser intrínseca, quando a paciente já apresenta resistência e o tratamento inicial não será efetivo nessas células[38], ou adquirida, por exposição à droga ao longo do tratamento, resultando na diminuição da sua eficiência. A resistência à cisplatina, por ser um problema grave no tratamento de diversos tipos de câncer, tem sido amplamente estudada e foi descrita como tendo aspecto multifatorial. Os mecanismos moleculares que caracterizam a resistência à cisplatina incluem diminuição no influxo da droga para o meio intracelular, aumento no efluxo da droga para fora da célula, diminuição da toxicidade da cisplatina por conjugação a moléculas contendo tiol, aumento no reparo ao dano no DNA causado pela cisplatina e mudanças nas vias de sinalização para evitar apoptose ou outros tipos de morte celular. Esses mecanismos podem atuar sozinhos ou combinados para caracterizar resistência do tumor à cisplatina, evitando a apoptose e permitindo a contínua proliferação das células tumorais.[38]

1.5.1 Mecanismos de resistência tumoral à cisplatina

1.5.1.1 Influxo/efluxo de cisplatina

A diminuição da concentração intracelular de cisplatina é um dos fatores que levam à resistência e pode ser observado em linhagens celulares resistentes à cisplatina.[39] A diferença entre influxo/efluxo de cisplatina pode ser causada tanto pela menor absorção da droga pela célula como pela maior remoção da droga de dentro da célula. A cisplatina pode entrar na célula por transporte passivo ou por meio de

transportadores, como os transportadores de homeostase de cobre CTR1 e CTR2[39], assim como ser removida do meio intracelular por ação de transportadores como ATOX1, ATP7A e ATP7B. O aumento da expressão do transportador ATP7B, por exemplo, já foi correlacionado com resistência à cisplatina em câncer de pulmão de células não pequenas.[39]

1.5.1.2 Detoxificação

A cisplatina no plasma sanguíneo se apresenta principalmente em sua forma inativa por estar presente em um ambiente com alta concentração de cloretos. Contudo, dentro da célula essa concentração diminui, fazendo com que a molécula de cisplatina dissocie seus íons de cloro, que são substituídos por moléculas de água. Nessa forma, a cisplatina é reativa e, caso chegue ao núcleo, irá interagir com o DNA. Um dos mecanismos de resistência celular à cisplatina é a diminuição da sua citotoxicidade pela interação com moléculas contendo grupos tióis no citoplasma. A cisplatina tem alta afinidade e pode interagir com glutationa e metalotioneína, diminuindo sua concentração reativa e citotóxica intracelularmente.[39]

1.5.1.3 Reparo a danos no DNA

A citotoxicidade da cisplatina se dá por meio da formação de adutos com o DNA, os quais desencadeiam uma série de vias de sinalização que culminam na morte celular. Contudo, o reparo ao dano causado pela cisplatina no DNA pode ser reparado, evitando a perpetuação do sinal e criando resistência ao efeito causado pela cisplatina. O reparo por excisão de nucleotídeos é o principal responsável pela remoção do dano causado pela cisplatina, pois repara as interações que causam mudanças na estrutura do DNA e consequente inibição da transcrição e replicação.[40] O reparo de erro de pareamento também é um dos mecanismos que pode ser utilizado para o desenvolvimento de resistência, no qual o pareamento incorreto da base nucleotídica com a molécula de cisplatina é reconhecido e corrigido. O reparo de quebra de fita dupla atua em um estado de dano ao DNA mais avançado, o qual pode ser realizado pela recombinação homóloga ou não homóloga das fitas do DNA. Dessa forma, qualquer reconhecimento de dano ao DNA pode desencadear o recrutamento de uma gama de proteínas que por sua vez, podem reverter o dano causado pela

cisplatina, sendo o ERCC1 gene um exemplo de gene que codificam proteínas reonsaveis pelo reparo do DNA.[41]

1.5.1.3 Sinalização da apoptose

O mecanismo final de resistência à cisplatina é a inibição da via de sinalização da apoptose em si, independentemente do dano causado ao DNA. A proteína supressora de tumor p53 tem papel importante nesta via. A supressão dessa proteína causa diminuição da expressão de diversos genes pró-apoptóticos, resultando em um caráter resistente à cisplatina em vários tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão de células não-pequenas.[41] A cisplatina desencadeia uma resposta por meio proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como a proteína quinase c-Jun N-terminal ativada por estresse (SAPK/JNK) e p38 quinases. Essas vias podem ser ativadas por diversas outras proteínas, que podem ter a inibição da apoptose como resultado final e, consequentemente, a resistência à cisplatina.[41]

1.6 Quimioterapia intraperitoneal (QT IP)

A quimioterapia intraperitoneal (QT IP) consiste na administração de quimioterapia dentro da cavidade peritoneal (Figura 9). O principal benefício vem da baixa absorção sistêmica de drogas através da barreira hemato-peritoneal. Esta terapia permite que altas concentrações do medicamento, no caso a cisplatina, possa estar em contato direto com tumores microscópicos ou células circulantes em líquido ascítico.[42] Neste contexto, três grandes estudos randomizados mostraram respostas melhores para entrega de quimioterapia intraperitoneal e uma meta-análise de todos os estudos relatou benefício claro para pacientes que receberam, pelo menos, parte sua terapia pela via IP.[43]

Atualmente, a combinação de quimioterapia IP e intravenosa (IV) tem demonstrado benefício em ganho de sobrevida e foi observado um aumento significativo na sobrevida global das pacientes que receberam quimioterapia intraperitoneal (IP) dos 49 aos 66 meses (protocolo do *Gynecology Oncology Group* - GOG 172)[43] comparada à quimioterapia intravenosa experimental para o CEO Contudo, apesar da extensa mediana de sobrevida de 16 meses no grupo IP/IV, a taxa de recorrência foi de 65% no período do estudo. Além de questões relacionadas

ao desenho destes estudos e das complicações frente à infecção dos cateteres peritoneais, infecções de maneira geral e logísticas (centros especializados) impediram que este tratamento fosse amplamente adotado na prática clínica.

Logo, novas abordagens terapêuticas na tentativa de melhorar a atividade da cisplatina foi idealizada. Desta forma, um novo racional foi proposto com a hipertermia, a quimioterapia intraperitoneal com hipertermia (HIPEC), onde o objetivo é utilizar a quimioterapia aquecida (cisplatina) para melhorar os resultados.[44]

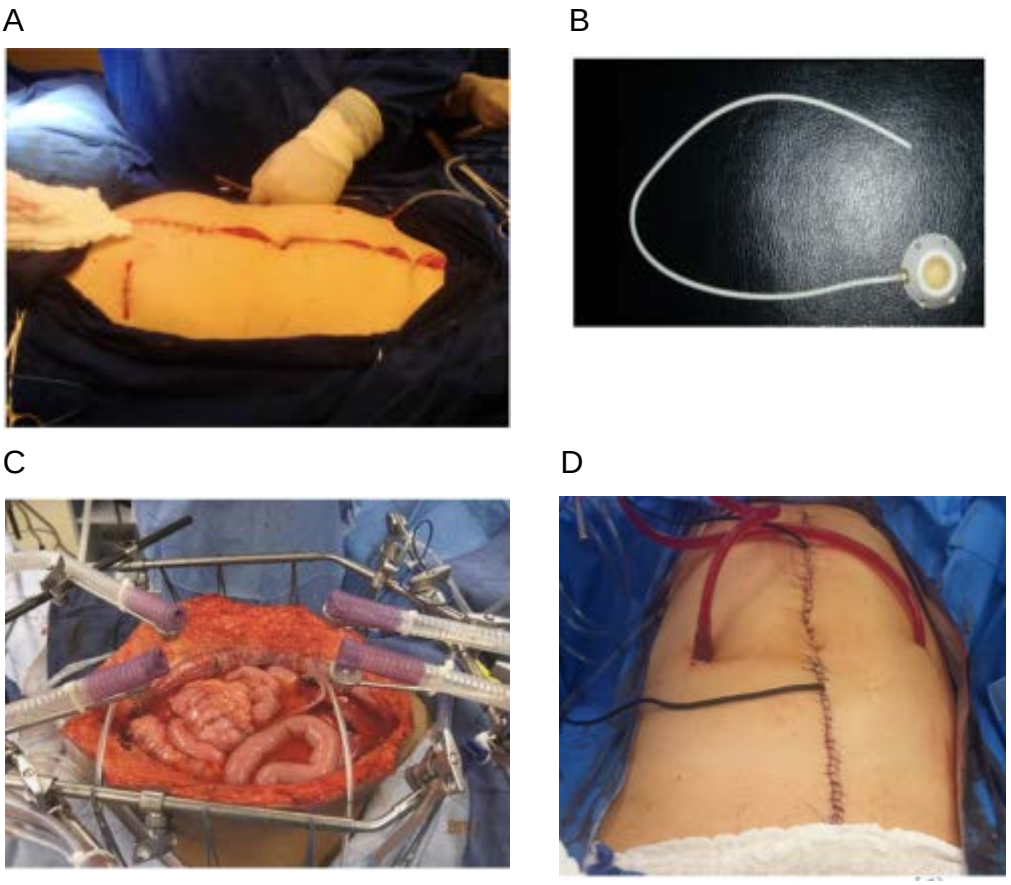


FIGURA 9. Quimioterapia Intraperitoneal. Fechamento de cavidade (A). Catéter intraperitoneal (B). Cirurgia citorredutora (C). Infusão de quimioterapia (D).
Fonte: Agnaldo Lopes da Silva Filho (2018).

1.7 HIPEC (Quimioterapia Hipertérmica Intraperitoneal) como modalidade de tratamento na doença peritoneal

HIPEC consiste na quimioterapia intraperitoneal com hipertermia, introduzida pela primeira vez como método de tratamento peritoneal de metástases de câncer de colorretal. É atualmente o padrão de tratamento de neoplasias epiteliais apendiculares, pseudomixoma peritoneal e mesotelioma peritoneal maligno difuso.[44]

O método evoluiu como um tratamento de metástases peritoneais em geral.[45] A estratégia de utilizar a hipertermia na faixa de temperatura de 41 a 43ºC tem como princípio que o calor possa aumentar a penetração de drogas em doença microscópica, fator considerado limitante da eficácia da QT IP. Além disso, esta técnica permite que maiores concentrações dos agentes citotóxicos cheguem aos tecidos quando comparada com a via sistêmica, proporcionando uma menor absorção sistêmica da quimioterapia e impedindo os mecanismos de reparo do DNA da célula tumoral.[45]

HIPEC é administrada logo após a citorredução por uma técnica aberta ou fechada.[45] Na técnica aberta, a parede abdominal é levantada ao redor do local da incisão criando um reservatório aberto. Esta técnica aberta tem a vantagem de controle, uma vez que os cirurgiões podem monitorar o procedimento e assegurar uma circulação adequada do medicamento.[46] Na técnica fechada, os tubos inseridos nas incisões abdominais direcionam o fluxo da solução de quimioterapia aquecida (figura 10). A técnica fechada permite a administração da quimioterapia aquecida de forma contínua, utilizando reservatório com filtro, duas bombas, um permutador de calor, cateteres de silicone para entrada e saída do abdome, um termostato e tubos interconectados.[46] O procedimento dura em torno de duas a três horas, porém existem estudos com variação de temperaturas e tempo de duração.[46] Em duas revisões sistemáticas da literatura sobre HIPEC, foi evidenciado uma morbidade de 40% e mortalidade de 10%.[46] O HIPEC fechado também pode ser combinado com laparoscopia.[46] Contudo, ressalta-se que HIPEC é raramente considerada sem citorredução completa prévia, uma vez que a que citorredução incompleta diminui a eficácia do tratamento e do benefício de ganho de sobrevida global.[47,49]

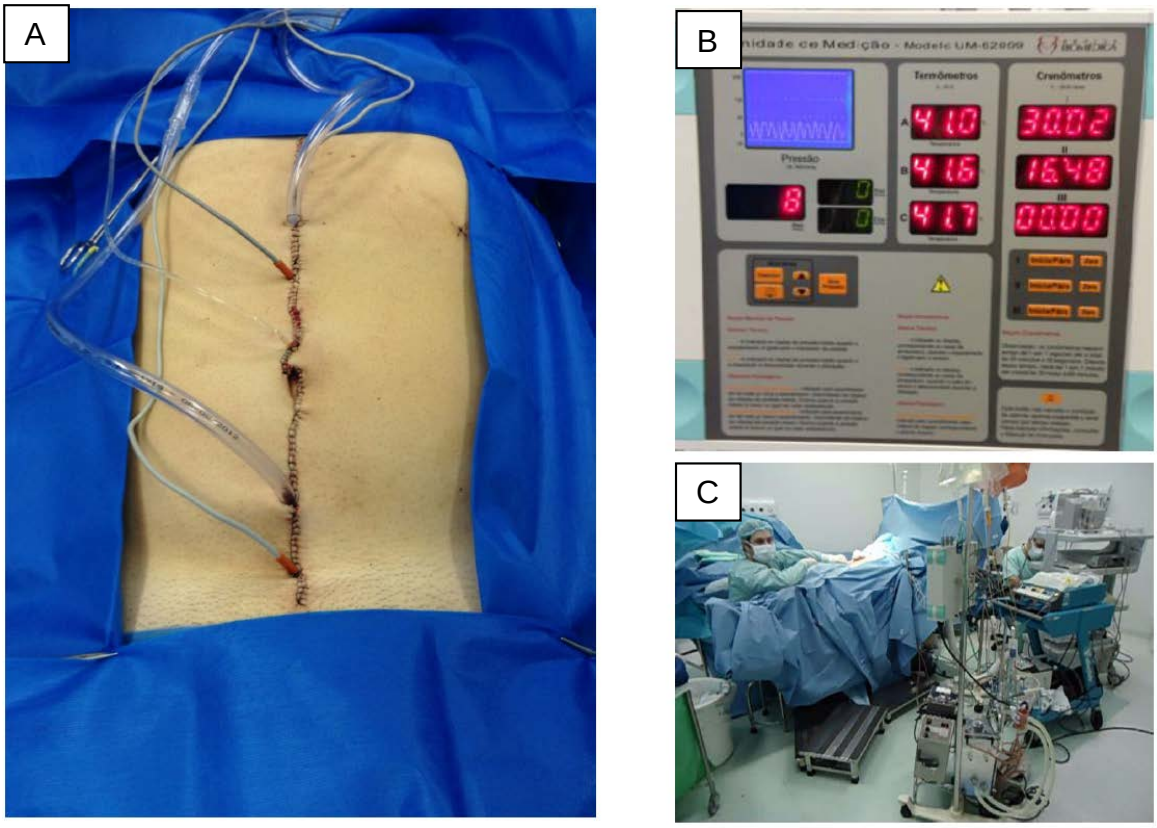


FIGURA 10. Procedimento de HIPEC. HIPEC fechada A). Máquina de HIPEC evidenciando temperatura a 41ºC (B). Estrutura montada para procedimento no centro cirúrgico (C).
Fonte: Agnaldo Lopes da Silva Filho (2018).

O HIPEC difere do tratamento de QT IP no pós-operatório, pois é um tratamento único de quimioterapia intra-operatório no momento da cirurgia citorredutora, evitando implantes de dispositivo de acesso peritoneal (cateter).[48]

Vários estudos com drogas, temperaturas e resultados diferentes foram publicados sem mostrar os ganhos de sobrevida e com várias críticas de metodologia. Entretanto, em 2018, um estudo holandês randomizado de fase III foi publicado no *New England Journal of Medicine*, denominado Ovhipec, evidenciou ganho de sobrevida.[50]

O estudo holandês denominado Ovhipec e avaliou 245 pacientes com CEO no estadio III com doença, pelo menos estável, após três ciclos de quimioterapia neoadjuvante com carboplatina e paclitaxel. A seguir, foram submetidos à cirurgia citorredutora de intervalo. As pacientes com citorredução completa ou ótima foram randomizados aleatoriamente em dois braços com ou sem HIPEC e, após esta etapa, receberam três ciclos adicionais de quimioterapia com carboplatina e paclitaxel em ambos os braços do estudo. A análise dos dados foi feita em um seguimento mediano de 4,7 anos e mostrou que as pacientes que receberam HIPEC obtivem ganho de

sobrevida livre de recorrência de 14,2 meses *versus* 10,7 meses (HR 0,66 com *p* =0003) e benefício de ganho de sobrevida global (45,7 meses *versus* 33,9 meses; HR 0,67; IC 95% *p*=002), sendo que a porcentagem que tiveram efeitos adversos grau 3 e 4 foram semelhantes nos dois grupos.[50]

O estudo OVhipec utilizou cisplatina (100 mg/m^2 com fluxo de 1 l/min), 50% da dose perfundida inicialmente, 25% em 30 minutos e 25% em 60 minutos, totalizando 90 minutos por técnica fechada. As pacientes do grupo da HIPEC foram encaminhadas para o CTI. Os dados do estudo também mostraram que, com relação à qualidade de vida, não houve diferenças entre os dois grupos, porém a taxa de ielostomia e colostomia foi maior no grupo da HIPEC (72 *versus* 43%, p=0,04) e maior taxa de infecção (18% *versus* 11%). No entanto, não houve diferença do ponto de vista estatístico no tempo mediano de internação (10 dias *versus* 8 dias). Em relação às pacientes que conseguiram completar todo o tratamento com mais três ciclos de quimioterapia pós-operatório, também não foram observadas diferenças ente os dois grupos (90% *versus* 94%).[50]

Contudo, apesar de ser um estudo randomizado, várias questões ainda estão sem resposta em relação à HIPEC, ainda mais, em um cenário de tratamento do CEO em evolução e tendo novos medicamentos e estudos clínicos sendo realizados. Atualmente, temos os inibidores da PARP (inibidores de poli (ADP ribose) polimerase (PARPi) que demonstram ganhos importantes no tratamento de primeira linha e manutenção com bases nos estudos clínicos SOLO 1, PRIMA e PAOLA 1.[51,52] Tendo em vista estes recentes estudos validando novas drogas com excelentes respostas, é necessário entender se há ganhos com a utilização da HIPEC.

1.8 O papel das Proteínas de Choque Térmico na carcinogênese

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP) são proteínas conservadas ao longo da evolução, cuja expressão celular é induzida em variadas situações de estresse para a célula. Foram descobertas 1962 como um conjunto de proteínas encontradas em eucariotas e procariotas, induzidas por hipertermia e outras injúrias celulares.[53] Desde sua descrição em 1962 por Ritossa *et al*. em células de glândulas salivares de *Drosophila busckii*, foi demonstrada que a sujeição das larvas deste inseto a um choque térmico por 30 minutos, determinava uma alteração do padrão de espessamento cromossomal. Como esses espessamentos são locais de

intensa atividade transcricional, a mudança de padrão evidenciava que o choque térmico havia ativado um conjunto de genes. Estes genes determinavam a expressão de um grupo específico de proteínas e também demonstraram que a variação no padrão de espessamento cromossomal ocorria quando a temperatura atingia rapidamente um valor limiar determinado, e não em resposta a qualquer variação brusca de temperatura de amplitude.[54] Logo, o termo proteína de choque térmico (HSP) tem sido usado para as proteínas induzidas pelo calor.[54] Estas proteínas são classificadas de acordo com seu peso molecular: HSP90, HSP10, HSP60, dentre outras, e tem efeitos altamente citoprotetores, comportando-se como chaperonas moleculares para outras proteínas. Todas as ações estão voltadas, em última análise, para o restabelecimento da homeostase após estresse.[55]

Algumas destas proteínas são expressas em situação de normalidade e são constitutivamente abundantes em células normais. Outras se tornam hiperexpressas mediante estresse. Sua expressão é constitutiva ou induzida por vários fatores fisiológicos, ambientais e patológicos tais como estresse térmico, hipóxia, inflamação, agentes tóxicos, metais pesados e o câncer. Em resposta a estes fatores, os membros das HSP são principalmente regulados por um processo chamado “resposta ao choque térmico” que envolve o fator 1 do choque térmico (HSF1).[56] A transcrição do gene HSP é regulada pelo fator do choque (HSF) que assegura a ativação transcricional durante o estresse celular e desativa após sua recuperação. Em contraste, o HSF1 parece manter-se constitutivamente ativo em células malignas indicando a presença de estresse proteotóxico crônico.[57]

Foi evidenciado que o HSF se separa das HSP, forma um trímero que entra no núcleo e liga-se ao elemento do choque térmico (HSE), região promotora das HSP. Quando ocorre a ligação entre o HSF1 e o HSE, dá-se à transcrição de genes que codificam as três principais famílias HSP induzidas pelo estresse associadas ao câncer (HSP70, HSP27 e HSP90) como demonstrado no desenho esquemático da Figura 11.[58]

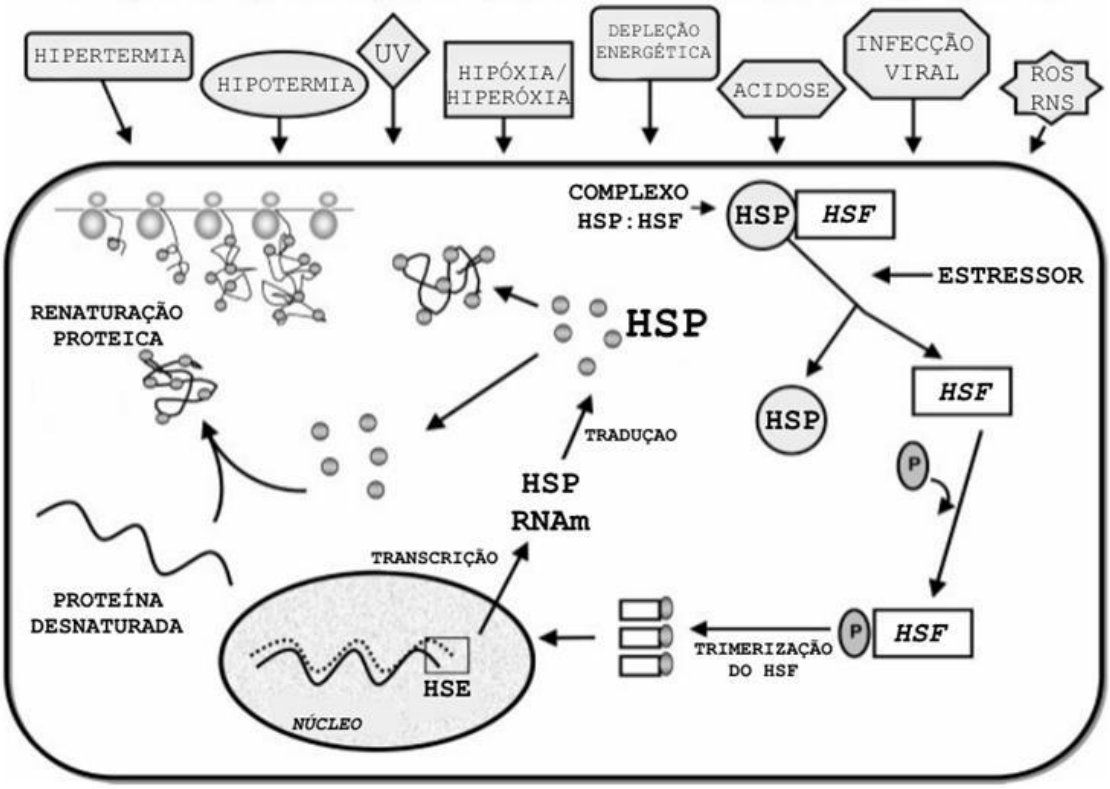


FIGURA 11. Esquema de tradução das proteínas de choque térmico (HSP) a partir do fator do choque térmico (HSF).
Fonte: Adaptado de Kregel, 2020.

A evidência acumulada sugeriu a contribuição do HSF1 para a carcinogênese e foi demonstrado que uma vez ocorrido o estresse celular, estas proteínas funcionam como chaperonas de outras proteínas e modulam diretamente as vias de sinalização de apoptose. As proteínas de choque térmico agem em múltiplos pontos da cascata de apoptose para garantir que o dano induzido pelo estresse não “dispare”, de forma inapropriada, a cascata celular de apoptose.[59]

Foi demonstrado que as HSP desempenham papel duplo na apoptose, promovendo ou neutralizando a morte celular. As HSP ativam mediadores apoptóticos, como a pró-caspase 3 e, inversamente, ligam e inibem várias moléculas em diferentes níveis na via apoptótica.[59] Entre os eventos anti-apoptóticos está o bloqueio da liberação do citocromo C, além de antagonizar as capases 3 e 9.[59]

O envolvimento das proteínas de choque térmico no desenvolvimento e progressão do câncer é um assunto extremamente estudado e debatido. Seu papel na carcinogênese ocorre em virtude de suas funções anti-apoptóticas e muitos estudos já observaram a hiperexpressão destas proteínas em tumores malignos de

vários sítios.[58] Em contraste com as células normais que não sofrem qualquer transformação, a expressão das proteínas de choque térmico está anormalmente elevada em células ou tecidos de vários tipos de tumores malignos.

Dados atuais mostram que alguns tipos de proteínas de choque térmico têm um papel fundamental como facilitador da transformação maligna, progressão do tumor e sobrevida do mesmo.[58] Foi evidenciado que as HSP acompanham vários oncogenes, incluindo o gene *P53*, impedindo sua degradação. Isso evita a via apoptótica clássica e resulta na sobrevivência das células cancerígenas. A contribuição das proteínas de choque térmico para a tumorigênese pode ser atribuída às suas atividades pleiotrópicas, como chaperonas moleculares que proporcionam à célula cancerosa uma oportunidade para alterar atividades de outras proteínas, em particular, as componentes do ciclo celular (quinases e outras proteínas que influenciam crescimento celular tumoral) e apoptose.[60]

Por outro lado, as proteínas de choque térmico também têm localização extracelular, algumas ligadas à membrana plasmática com função imunogênica, apresentando antígenos para as células apresentadoras de antígenos, o que aumenta o desenvolvimento de imunidade anti-tumoral.[59] É sabido também que níveis aumentados de certas HSP estão relacionados com resistência a medicamentos em alguns tipos de tumores e inclusive no câncer de ovário.[60] Devido à sua hiperexpressão e função nas células tumorais, estas proteínas vêm sendo extensamente estudadas como alvo terapêutico. Muitos autores também estudaram o uso de proteínas de choque térmico para o diagnóstico precoce, como marcadores preditivos de resposta e no seguimento de vários tumores malignos.[60]

1.8.1 Proteínas de choque térmico e câncer de ovário: Relação com prognóstico e resistência ao tratamento

Com relação ao CEO, já foi constatado que os níveis de expressão tecidual de alguns dos genes HSP e suas respectivas proteínas têm implicação no prognóstico das pacientes, bem como uma relação com resistência à platina.[61] Diante de dados levantados por estudos até o momento, as proteínas de choque térmico que exercem maior influência no câncer de ovário são HSPB1 (HSP27), HSPD1 (HSP60) e a TRAP1 (HSP90).[61, 62]

***HSPB1* (HSP27)**

A HSPB1 está localizada principalmente no citosol das células no câncer de ovário, dados da literatura indicam o envolvimento na patogênese deste tumor e resistência terapêutica.[63] A HSP27 é uma proteína envolvida na proliferação e diferenciação celular, apoptose e metástase de muitos tumores. A sua desregulação está associada com agressividade do tumor, pior prognóstico e resistência a quimioterapia.[64]

Yasuda *et al.* (2017) evidenciaram em seus estudos que o gene *HSPB1*, em resposta ao estresse, é expresso preferencialmente em células malignas e podem ser induzidos por ativação constitutiva do HSF1 na forma fosforiladas. Neste estudo, o HSF1 foi ativado por fosforilação do resíduo da serina 326 (Ser 326) em células iniciadoras do câncer. Esta fosforilação específica foi essencial para transcrição da HSP27. Também foi observado que os níveis da expressão da HSP27 aumentaram para as amostras fosforiladas e diminuíram para as não fosforiladas. Estudo recentes demonstraram que o mTOR tem papel importante na regulação e resposta ao estresse e na fosforilação do HSF1 em serina 326. Dessa forma, o mTOR ativado ao fosforilar o HSF1 (Ser 326), pode induzir a expressão da HSP27. A HSP27 está envolvida em múltiplas vias de sinalização que são importantes para o processo da carcinogênese, entre elas a via do p53 que é implicada na supressão tumoral e a via NF-KB (fator nuclear Kappa B) envolvida na progressão tumoral e metástase. A expressão da HSP27 suprime a via P53, inibindo acúmulo de P21, podendo levar as células malignas a evadirem-se da senescência e desenvolvem tumores. Já a via da NFkB, ao ser regulada pela HSP27, poderia tornar as células tumorais resistentes a apoptose, além disso várias funções importantes das proteínas podem ser remodeladas pela HSP27 para sobrevivência destas células tumorais.[65]

A expressão desta proteína no CO já foi estudada, no entanto os dados são conflitantes. El Strand *et al*. (1996) mostraram que há associação entre expressão de HSPB1 e tumores de alto grau, realizada por meio de imunohistoquímica, a partir de células malignas em líquido ascítico, tumores primários e metástases.[66] Langdom *et al.* (1995) encontraram resultados semelhantes, utilizando a técnica ELISA, em tumores primários e linhagens celulares.[67] A resposta imunológica à HSPB1 também está aumentada nas mulheres com CO e outros tumores ginecológicos e alguns estudos sugerem a utilização de concentrações de anticorpos anti-HSPB1 para diagnóstico precoce de recaída ou progressão da doença.[62]

Apesar de alguns autores mostrarem uma associação da HSPB1 com estadiamento precoce da doença e maior sobrevida dos pacientes, a maior parte dos estudos sugere uma associação entre hiperexpressão de HSPB1 e um pior prognóstico.[69] Um destes estudos, realizado por Geisler e colaboradores (2004) avaliou a expressão de HSPB1 por imunohistoquímica em amostras obtidas de tumores ovarianos, concluiu que a hiperexpressão da proteína é um fator independente de prognóstico, mesmo depois de 60 meses de seguimento das pacientes.[70]

No que diz respeito à relação da HSPB1 com resistência do tumor de ovário à platina, parece haver uma correlação positiva entre a expressão de HSPB1 e resistência à quimioterapia. Schneider *et al.* (1998), utilizando imunohistoquímica em amostras de tumor de ovário, demonstraram que há coexpressão de HSPB1 e MDR1 (gene de resistência a múltiplas drogas).[71] Estudos clínicos como o GOG 111 OV-10, demonstraram que quimioterapia com cisplatina e paclitaxel era superior ao esquema com cisplatina e ciclofosfamida.[72] Os resultados favoráveis ao esquema com cisplatina e paclitaxel foram atribuídos a capacidade do paclitaxel em suprimir a HSP27.[73] Este mesmo grupo de pesquisador também demostrou um papel importante da HSP27 na regulação e disposição da tubulina, especialmente na fase G2 da mitose do ciclo celular.[73]

Há estudos mostrando que o aumento da expressão da HSPB1 está associado a progressão e agressividade do tumor ovário.[71] Foi evidenciado níveis de RNAm e de proteína claramente elevados em pacientes CEO com metástase peritoneal em comparação com pacientes sem metástase peritoneal.[73]

HSPD1 **(HSP60)**

O gene *HSPD1* é expresso constitutivamente na maioria das células e seu transcrito HSP60 é regulada por outra chaperona, chamada HSP10. Ambas estão localizadas na mitocôndria. Foi demonstrado que HSP60 regula o ciclo celular e apoptose por mecanismo mediado pelo gene *P53*.[74] Também foi relatado que o transcrito do gene *HSP60* existe em diferentes compartimentos celulares, incluindo o citosol e o núcleo bem como no ambiente extracelular.[74]

A expressão de *HSP10* varia muito entre as pacientes com CO e sua hiperexpressão em pacientes tratados com platina parece conferir um pior prognóstico. Kimura *et al*. (1993) sugerem um papel para esta proteína na resistência

à platina e hipertermia e correlacionam uma piora na sobrevida com o aumento da expressão da proteína. Um estudo realizado em culturas de células de cabeça e pescoço mostrou uma correlação entre níveis de RNA mensageiro de HSP60 e resistência à platina.[74]

Os estudos iniciais que avaliaram o HSP60 em pacientes com CO revelaram níveis detectáveis e variáveis de RNA mensageiro do HSP60 nos tecidos de carcinoma ovariano. Estudos *in vitro* com células de carcinoma de ovário A2780 que foram selecionadas para resistência a cisplatina ou oxaliplatina, demostraram uma implicação da hiperexpressão do gene *HSPD1* e seu transcrito com a resistência a estas drogas. Estudos mais recentes demonstraram diminuição da sobrevida global em pacientes com CO de ovário que expressam altos níveis de HSP60 sugerindo um potencial biomarcador prognóstico.[74]

Em relação a cooperação entre os transcritos HSP60 e HSP10, em termos de formação de um complexo molecular funcional, ficou demonstrado que o HSP10 pode modular a resposta imune em pacientes com neoplasia de ovário avançada. Sendo este achado evidenciado quando se detectou em líquido ascítico e soro de pacientes com câncer de ovário, que o HSP10 suprime a expressão da cadeia zeta transdutora de sinal associada ao receptor de células T (TCR) (CD3-zeta) levando a uma resposta imunológica diminuída das células T e, finalmente, disfunção das células T mediada pelo tumor.[74]

***TRAP 1* (HSP90L)**

A TRAP1 (receptor de fator de necrose tumoral associado a proteína 1) é uma proteína de choque térmico de 75-kd, com funções antiapoptóticas e antioxidantes, componente da via mitocondrial da apoptose. Estas proteínas residem em diferentes organelas celulares, incluindo o reticulo endoplasmático, mitocôndrias e citosol.[75] Dados preliminares sugerem que TRAP1 pode ser um biomarcador valioso no CO. Na verdade, os níveis desta proteína são significativamente superior em linhagens de células de tumores ovarianos e em tumores ovarianos resistentes a platina. Ainda existem poucos dados sobre a relação desta proteína e prognóstico das pacientes com CO.[76]

O *TRAP1* foi fortemente expresso em células tumorais, como mama, colón, pâncreas e pulmões, enquanto a expressão basal foi detectada nas células normais correspondentes.[76]

***HSP1A, HSP1L* (HSP70)**

AS HSP70 compõem uma grande família de proteínas comumente associadas ao início e duração da tolerância térmica. Estas proteínas atuam na montagem, transporte e regulação de outras proteínas através de sua interação com segmentos peptídeos hidrofóbicos das proteínas em um processo regulado por ATP. Apresenta um importante papel na manutenção da viabilidade celular, uma vez que inibe a apoptose.[77]

Na resposta ao estresse, elas influenciam o dobramento de proteínas orientando renaturação e prevenindo a agregação proteica por meio da interação com as partes hidrofóbicas expostas da proteína alvo. Este mecanismo de dobramento é realizado em ciclos de ligação e liberação do substrato, que são acelerados pela hidrólise do ATP e modulados por co-chaperonas que interagem com HSP70 e regulam a atividade da ATPase.[78]

O aumento da expressão HSP70 pode prevenir a apoptose induzida pelo estresse, através da inibição do processamento das pró-caspases 9 e 3. Os estudos têm mostrado que a HSP70 também atua na via apoptótica intrínseca por meio da prevenção da perda do potencial da membrana mitocondrial externa, o que impede a liberação de citocromo C. Já foi comprovado que a HSP70 também atua na via apoptótica extrínseca, inibindo as moleculares sinalizadoras secundárias que estão envolvidas na cascata desencadeada pela ativação dos receptores de mortes presentes na membrana celular.[79]

1.9 Everolimus: inibidor da via do m-TOR

A via do mTOR foi caracterizada na década de 90 ao ser estabelecida como alvo celular da rapamicina, composto incialmente empregado como antifúngico. O mTOR é uma serina treonina cinase relacionadas a via PI3K sendo filogeneticamente conservado ao longo da evolução. Sua função é de uma proteína efetora da via de sinalização de PI3K a qual regula processos de crescimento, proliferação, síntese de proteínas e sobrevivência celular.[80]

O mTOR é um composto catalítico de dois conjuntos multiproteicos funcionalmente e estruturalmente distintos, o complexo mTOR1 (mTORC 1) e o complexo 2 de mTOR (mTORC2). O mTOR1 sensível à rapamicina consiste em

mTOR, raptor e mLST8. Trabalhos recentes revelam que o PRAS40 e Deptot são componentes bem como substrato de mTORC1. O mTORC2 contém mTOR, Rictor, MSIN1, mLST8 e o Deptor. O mTORC2 não é inibido diretamente pela rapamicina.[81]

Os fatores de crescimento regulam a atividade de mTORC1 por meio da via PI3K/AKT ou da via RAS/MAPK, o qual converge no complexo heterodimérico da esclerose tuberosa (TSC1-TSC2). Foi caracterizado que a sinalização hiperativa de mTORC1 aumenta a síntese de proteínas e a detecção disfuncional de nutrientes desafiam a integridade da homeotase proteica.[82]

O bloqueio da via de PI3K/AKt/mTOR já é realizado na prática clínica através de alguns agentes, como o everolimus, o qual faz parte do arsenal terapêutico de controle do câncer, sendo utilizado em diversos tumores, tais como câncer renal, tumor neuroendocrino do pâncreas e câncer de mama.[82] O everolimus é um análogo da rapamicina, cujo o mecanismo de ação leva à inibição da via do mTOR. Desta forma, assim como a rapamicina, o everolimus se associa ao receptor intracelular FK506 *binding protein* 12 (FKBP12) e forma um complexo que interage com o domínio FRB de mTOR em mecanismo alostérico de inibição da cinase. Estudos têm demonstrado a capacidade desta droga em inibir TORC2.[83]

2. Justificativa do Estudo

Atualmente, há um grande interesse clínico em novas abordagens terapêuticas para o CEO, tendo em vista o contexto de uma doença muito agressiva e silenciosa. Na maioria dos casos, diagnosticada como doença localmente avançada. E mesmo com todo o arsenal terapêutico disponível no momento, ainda não conseguimos aumentar as taxas de cura, pois estas pacientes recidivam em 18 meses.

Logo, novas terapêuticas são necessárias e muito bem-vindas, dentre elas a QT IP e a HIPEC, frente a um cenário de uma doença primária ou metastática. Contudo, é importante ressaltar que muitas perguntas ainda não foram respondidas tais como: qual a melhor droga utilizada na HIPEC? Qual o melhor protocolo de infusão? Quais pacientes são candidatas a estes procedimentos? Existe algum perfil molecular que possa predizer a resposta a esse tipo de tratamento? É possível melhorar os resultados da HIPEC?

Neste contexto, o papel das HSP precisa ser melhor entendido no CEO já que existe um racional entre exposição ao calor e produção de proteínas do choque térmico. Neste sentido, os desenhos dos estudos de terapêutica oncológica, envolvem cada vez mais a biologia molecular para estabelecer múltiplas vias de ataque ao tumor e abordagem terapêutica. A avaliação de possíveis marcadores prognóstico e preditivos tornaram-se cada vez mais uma necessidade.

Sendo assim, as HSP são alvos promissores para desenvolvimento e testagem de novos agentes antineoplásicos. Os estudos já realizados na área, ainda são preliminares no que diz respeito ao entendimento dos mecanismos de resistência mediados por estas proteínas e o que elas representam na avaliação prognóstica das pacientes com CEO. Como já foi explicitado, o CEO, do ponto de vista molecular, é uma doença extremamente heterogênea.

Diante deste fato, o aumento na sobrevida livre de recaída e da sobrevida global são desfechos clínicos desejados e podem ser alcançados à medida que o entendimento das vias de sinalização de apoptose e das vias de sinalização das proteínas do choque térmico, em relação às novas técnicas de tratamento oncológico, sejam melhor compreendidas.

A despeito dos poucos estudos existentes sobre as relações do CEO e as HSP, QT IP, HIPEC, bem como a dificuldade logística para esta avaliação em estudos clínicos, foi proposto uma avaliação experimental *in vitro* visando responder algumas

destas perguntas, além de abrir uma diretriz para uma avaliação futura nos estudos clínicos. Os genes responsáveis pela tradução das HSP, selecionados para esta pesquisa, estão relacionados ao prognóstico e/ou preditivo relevantes já estudados em CEO.

Esta pesquisa *in vitro* proporcionará maior conhecimento sobre aspectos genético-moleculares do CEO, em relação ao papel das HSP, e representa um importante passo para o desenvolvimento de um estudo clínico que comprove os achados. A proposta de um estudo translacional com este perfil é aumentar o conhecimento das vias de sinalização relacionadas à exposição ao calor, utilizando uma metodologia mais sensível (PCR quantitativa em tempo real - qPCR) e estabelecendo um elo entre o conhecimento gerado pela pesquisa translacional de bancada para a prática clínica.

Na tentativa de entender melhor a doença em questão, individualizar os tratamentos e responder algumas questões em relação as proteínas do choque térmico e câncer de ovário, algumas hipóteses foram propostas neste estudo:

Hipótese 1: Quimioterapia hipertérmica (HIPEC) é superior à quimioterapia normotérmica.

Hipótese 2: O emprego da salina aquecida (hipertérmica) de forma isolada não difere da quimioterapia hipertérmica.

Hipótese 3: A hipertermia pode alterar a expressão dos genes das HSP.

Hipótese 4: O uso do inibidor do mTOR com everolimus pode melhorar os resultados da quimioterapia hipertérmica.

.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, em um ensaio *in vitro*, se quimioterapia hipertérmica é superior à quimioterapia normotérmica em relação à sobrevivência celular em diferentes linhagens de células de câncer de ovário.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar linhagens celulares de câncer de ovário TOV-21G (adenocarcinoma de células claras Grau III), SKOV-3 (adenocarcinoma de metástase peritoneal resistentes à platina) e OV-90 (adenocarcinoma serosos de alto grau, derivado de líquido ascítico) para realização dos ensaios.
- Realizar ensaios de citotoxicidade, utilizando o método MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para calcular o valor do IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células) e consequentemente a taxa de sobrevida das linhagens de células de ovário com cisplatina aquecida e não aquecida.
- Avaliar a capacidade reprodutiva de uma única célula (capacidade de formar colônias) após os tratamentos realizados.
- Avaliar a expressão dos genes das proteínas do choque térmico *(heat schock protein* = HSP) *TRAP1*(HSP 90)*, HSPB1*(HSP27)*, HSPD1* (HSP60)*, HSPA1L, HSPA1A* (HSP70) após tratamento com cisplatina hipertérmica e cisplatina normotérmica.
- Comparar a diferença na expressão destes genes HSP nos diferentes tipos de tratamentos realizados e associar o perfil de expressão gênica com as implicações na evolução das linhagens celulares, bem como resistência à quimioterapia.
- Avaliar se o everolimus é eficaz em aumentar a sensibilidade à platina no modelo *in vitro.*

4. Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo celular

As linhagens celulares de câncer de ovário, TOV-21G (adenocarcinoma de células claras grau III, catálogo. CRL-11730™), SKOV-3 (adenocarcinoma, catálogo. HTB-77™) e OV-90 (adenocarcinoma seroso grau III, derivado de ascite, catálogo CRL-11732™) foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivadas no meio DMEM Alta Glicose (Gibco cat. 12100-038) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco cat. 210115-K), 1% de L-glutamina 0.2 M, 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® cat. M7145), D-glucose (Sigma® cat. G7021) e 1% de piruvato de sódio (Sigma cat. P2256). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo para adesão celular, em estufa a 37ºC com atmosfera umidificada e enriquecida com 5% de CO_2. Antes de cada experimento, as células foram submetidas à procedimentos de repique celular utilizando uma solução enzimática de tripsina/EDTA por cinco minutos na estufa. Os ensaios foram realizados obedecendo as passagens para cada linhagem celular.

4.2 Ensaio de citotoxicidade celular (MTT)

Para determinação da citotoxicidade celular, foi realizado um ensaio, semeando em triplicatas as linhagens celulares em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: TOV-21G ($2x10^4$ células/poço), SKOV-3 ($2,5x10^4$ células/poço) e OV-90 ($5x10^4$ células/poço). Após atingirem confluência celular em torno de 70% de um dia para o outro, as linhagens foram tratadas com seis diluições seriadas da solução injetável diluída em solução salina, do quimioterápico cisplatina (Blau® Farmacêutica lote 19060288, Cotia - SP). Para a linhagem TOV-21G, foram testadas as seguintes concentrações: 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. E para as linhagens celulares SKOV-3 e OV-90, foi avaliada a citotoxicidade nas seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL de acordo com estudos prévios realizados em nosso laboratório com estas mesmas linhagens. As linhagens também foram tratadas somente com o meio de cultura ou apenas com a solução salina. Após o tratamento, as placas foram incubadas em estufas a 37ºC ou a 41ºC.

Após 24h, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se o reagente MTT

(brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) diluído em meio sem suplementação à 0,5 mg/mL. Seguindo uma nova incubação por 3horas, e em seguida a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1000 RPM, o sobrenadante foi desprezado e 100 µL/poço do solvente orgânico DMSO (Merck® cat. #K35781952610), foram adicionados, a fim de solubilizar os cristais formados. Finalmente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® M5e) à 550 nM. Após a leitura no espectrofotômetro, a sobrevida das células contidas nos poços tratados foi calculada dividindo o valor da absorbância das células tratadas pela média do controle de vida e multiplicado por 100. Este ensaio foi repetido de maneira independente, três vezes. O valor de IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células) foi estimado para as linhagens tratadas com cisplatina não aquecida e aquecida a 41ºC, utilizando o programa gratuito Dr Fit versão 1.042.[68]

4.2.1 Análise de solubilização de everolimus e sobrevivência celular em diferentes concentrações de everolimus (Ensaio de MTT)

Everolimus (peso molecular: 958,224 g/mol) foi suspenso em dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado para o tratamento de linhas celulares OV-90 por 24 horas. Após o tratamento com everolimus, foram lavados com solução salina PBS e novamente tratados com cisplatina a 37ºC na concentração de 65,7 µg/mL e com cisplatina a 41ºC na concentração de 53,46µg/mL cujo IC_{50} já havia sido determinado previamente. Após 24 horas, a placa foi lavada com PBS e foi adicionado MTT (0,5 mg/mL).

4.3 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico permite avaliação das diferenças na capacidade reprodutiva de uma célula (capacidade que uma única célula possui em formar uma colônia com o mínimo de 50 células), entre as células controle não tratadas com aquelas submetidas a determinados tratamentos.[84]

Neste ensaio, foi utilizado o método descrito por Franken (2006).[84] As linhagens celulares TOV-21G e SKOV-3 foram semeadas em placas de 24 poços deixadas *overnight* para aderirem ao fundo da placa. Os grupos tratados receberam

cisplatina conforme o IC_{50} estabelecido para cada linhagem, ou o tratamento com PBS 1x e meio de cultura. As linhagens celulares foram submetidas aos tratamentos por 24h nas temperaturas de 37 e 41ºC. Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas e semeadas em triplicatas em placas de seis poços em triplicatas na densidade de 1,5 $x10^3$ células por poço. Após sete dias de incubação em estufa úmida contendo 5% de CO_2 a 37ºC as colônias de células foram lavadas com D-PBSA 1x (Sigma®, cat. 59331C), fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com cristal violeta 1% também por 10 minutos. Em seguida, foi feita a contagem das colônias. Foram consideradas apenas aquelas que apresentaram 50 ou mais células por colônia. Desta forma, a fração sobrevivente (FS) foi determinada dividindo-se o número de colônias formadas após os tratamentos pelo número de células plaqueadas, multiplicado pelo EP (Figura 11), sendo EP neste caso, a média das colônias formadas nos controles de vida, para cada experimento.

$$FS = \frac{\text{nº de colônias formadas após o tratamento}}{\text{células semeadas x EP}} \times 100$$

FIGURA 11. Fórmula para cálculo da fração sobrevivente
Fonte: Modificado de Franken *et al*., 2006.

4.4 Extração e quantificação do RNA total

O RNA total foi extraído das linhagens celulares em cinco diferentes condições: células cultivadas somente com meio de cultura ou tratadas com o IC_{50} determinado para cisplatina e submetidas a 37 e 41ºC, além disso, as células foram tratadas com solução salina (PBS 1x) aquecida a 41ºC. Para cada $1x10^6$ de células, foi adicionado 1 mL de Trizol® (Invitrogen TM, USA), conforme orientações do fabricante. O reagente foi homogeneizado juntamente com as células e, em seguida, o lisado celular foi transferido para microtubos de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente no vórtex, por aproximadamente 15 segundos. Posteriormente, amostras foram incubadas por 3 minutos a 30ºC, em banho seco. Após a incubação, centrifugou-se as amostras por

15 minutos a 12.000 *x g* em centrífuga refrigerada a 4ºC. Desta centrifugação formou-se, por diferença de densidade das substâncias, três fases, sendo a primeira fase contendo o RNA, a segunda fase contendo proteínas e a terceira fase contendo o DNA. Retirou-se a primeira fase contendo o RNA e transferiu-se para um novo microtubo, no qual foram adicionados 500 µL de isopropanol. A segunda fase contendo proteínas e a terceira fase contendo o DNA e proteínas foram armazenadas no freezer -80º C para estudos posteriores. A seguir, incubou-se o novo microtubo contendo RNA e isopropanol por 10 minutos a 30ºC, em banho seco. Centrifugou-se a 12.000 *x g* por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4ºC. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e iniciou-se o processo de lavagem com etanol 75%. Após a lavagem, deixou-se o precipitado secar por aproximadamente 15 minutos e o mesmo foi ressuspenso em água previamente tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). Obteve-se assim, o RNA total das amostras, e o mesmo foi armazenado a -80ºC. Foi quantificado o RNA total extraído em espectrofotômetro de microvolume *NanovueTM Plus Spectrophotometer* (*GE Heathcare Life*, USA).

4.5 Avaliação da integridade do RNA

Avaliou-se a integridade do RNA total extraído através de Eletroforese em gel de Agarose 1%. Pesou-se 0,50 g de Agarose e diluiu-se em 50 mL de TBE 1X. Adicionou-se 2,5 mL de Brometo de Etídio e deixou-se a solução solidificar no suporte para o gel com o pente de canaleta inserido. Prepararam-se as amostras para aplicação no gel, com os seguintes parâmetros: 0,5 µg de RNA, 5 µg de tampão de amostra e água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para um volume final de 10 µL. Aqueceram-se as amostras preparadas em banho seco por 3 minutos a 60°C. Após a solidificação do gel, retirou-se o pente de canaletas e posicionou-se o mesmo na cuba de eletroforese. Encheu-se a cuba com TBE 1X e aplicou-se as amostras em cada canaleta. A eletroforese foi realizada submetendo o gel a uma voltagem de 100 volts durante 40 minutos. Após a corrida, fotografou-se o gel em transiluminador e verificou-se a presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal íntegras e sem arraste.

4.6 Tratamento do RNA com DNAse

2 µg de RNA total foram tratados com o kit Turbo™ DNase (Invitrogen™ catálogo. AM2238) conforme as instruções do fabricante. Acrescentou-se em um microtubo 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão e 0,4 µL de DNAse. Completou-se o volume com água tratada com DEPC em quantidade suficiente para 20 µL. Incubou-se por 30 minutos a 37°C. Após as incubações, armazenou-se o RNA tratado em freezer -80°C.

4.7 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Utilizou-se o RNA total livre de DNA para realizar a síntese do cDNA a partir do RNA mensageiro utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™ catálogo. 4368814), conforme as orientações do fabricante. Realizou-se o procedimento de síntese de cDNA em câmara de fluxo unidirecional, previamente limpa com gaze embebida com álcool 70%, assim como todos os materiais como micropipetas, caixas de ponteiras, frascos e suportes. Após esse procedimento, deixaram-se todos os materiais expostos à luz UV por 20 minutos. Identificou-se os tubos utilizados de acordo com as amostras de RNA. Misturaram-se os reagentes, o tampão e a enzima em tubo estéril sobre o suporte de resfriamento Coolbox (Biocison). Sintetizou-se 20 µL de cDNA. Adicionaram-se, em cada microtubo identificado com o nome da amostra, os volumes de DNTP Mix e Oligo d(T). Em outra câmara de fluxo unidirecional exclusiva para *template*, adicionou-se o volume para 1 µg de RNA total cada microtubo contendo DNTP e Oligo d(T) e homogeneizou-se por pipetagem. Aqueceram-se tais microtubos em banho seco por 10 minutos a 70°C. Retiraram-se as amostras do banho seco e adicionou-se o master mix e, novamente incubados por 10 minutos a 25ºC, 120 minutos a 37ºC e, por fim, 5 minutos a 85ºC. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20ºC.

4.8 Avaliação da expressão dos transcritos

Avaliou-se a expressão dos genes *TRAP1*(HSP90)*, HSPB1* (HSP27) e genes da sua família *HSPA1A, HSPA1L* (HSP70) e *HSPD1* (HSP60) através de PCR Quantitativo em Tempo Real[90] usando sondas Taqman® e TaqMan® *Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific*™ cat. 4440038), conforme especificações do fabricante. A concentração de cada cDNA por reação foi de 100 ng. Foi utilizado, como controle,

o endógeno o gene *18S* como normalizador da reação. O volume final de cada reação foi de 20 µL em uma placa de 96 poços contendo as amostras de cDNA em duplicata com seus respectivos RNAs controles não convertidos à cDNA (NORT's). Os controles NoRT e NTC foram incluídos no estudo para monitorar contaminação por DNA genômico e dos reagentes, respectivamente. A amplificação e coleta de dados foi realizada pelo equipamento *QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific*™) de acordo com a ciclagem estabelecida pelo fabricante.

5. Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise estrutural das linhagens expostas aos tratamentos

As linhagens TOV-21G, SKOV-3 e OV90 foram descongeladas de acordo com as condições de temperatura e cultivadas em meio de culturas, conforme protocolo de procedimentos do laboratório. Em seguida, foram submetidas aos procedimentos adequados, como o repique e troca de meio de cultura, e após expansão foram congelados e armazenados em tanque de criopreservação e registradas como componente de banco de células. Durante o experimento, as células submetidas a procedimento de repique celular toda vez que atingiam confluência em torno de 70%. As figuras abaixo registram as morfologias, após tratamentos, das linhagens TOV-21G (Figuras 12 e 13), SKOV-3 (Figuras 14 e 15) e OV-90 (Figuras 16 e 17).

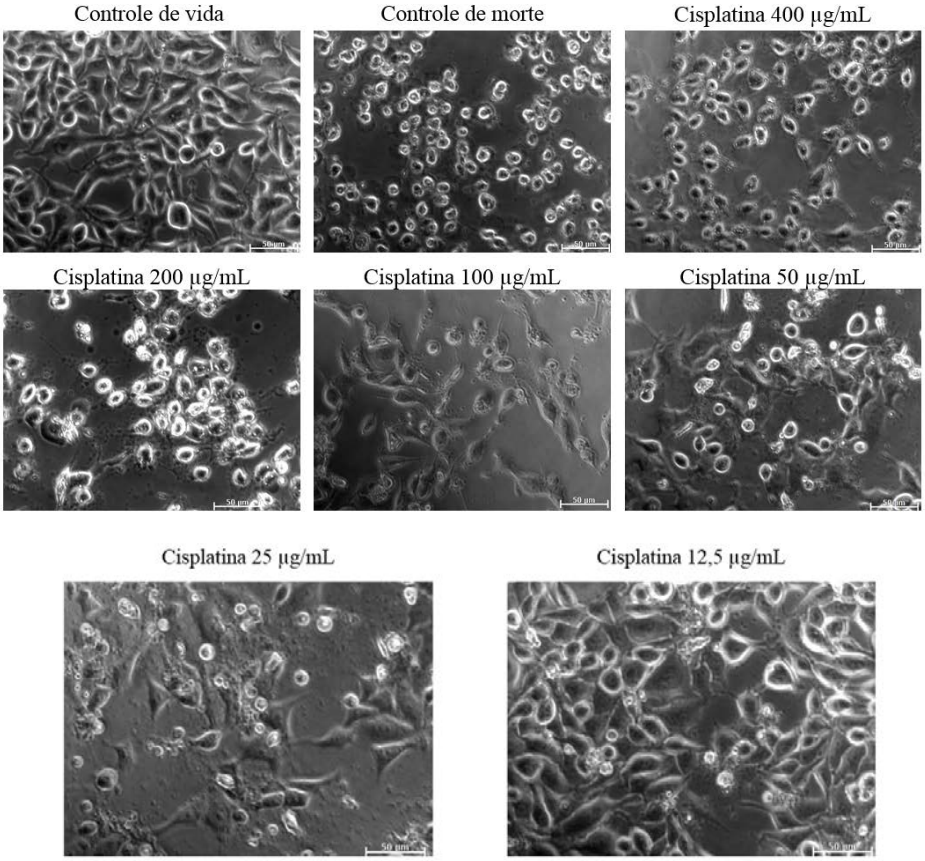


FIGURA 12. Registro da morfologia da linhagem TOV-21G exposta à cisplatina não aquecida.

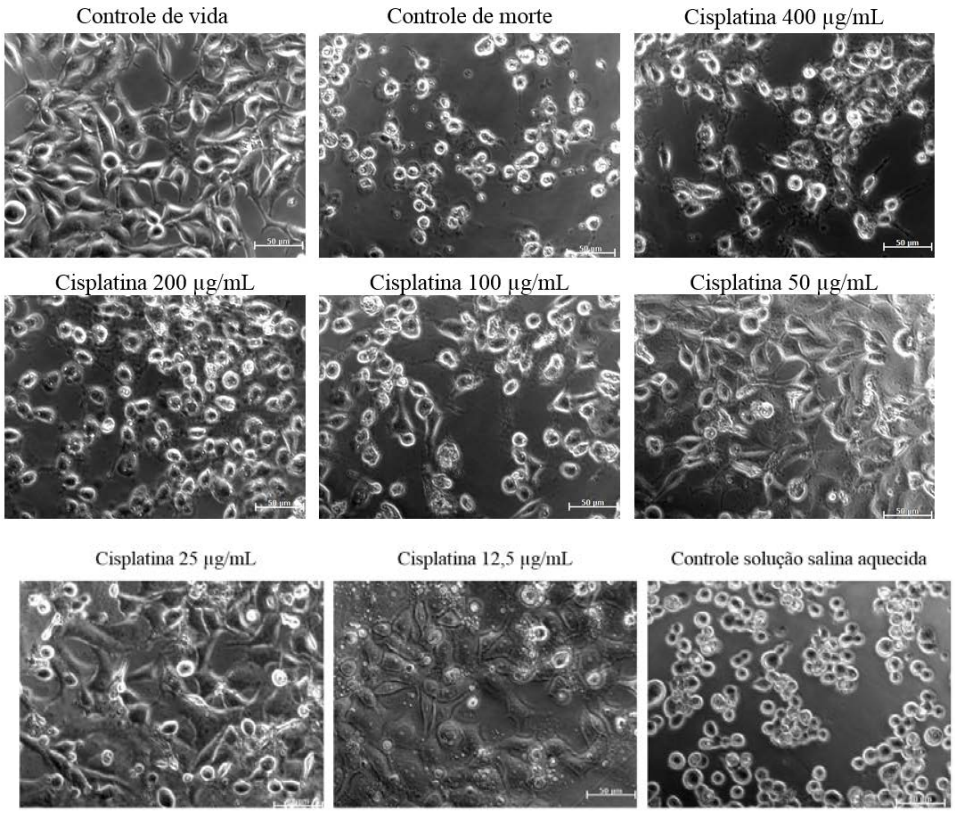


FIGURA 13. Registro da morfologia da linhagem TOV-21G exposta à cisplatina aquecida a 41ºC e mantida em estufa com a mesma temperatura.

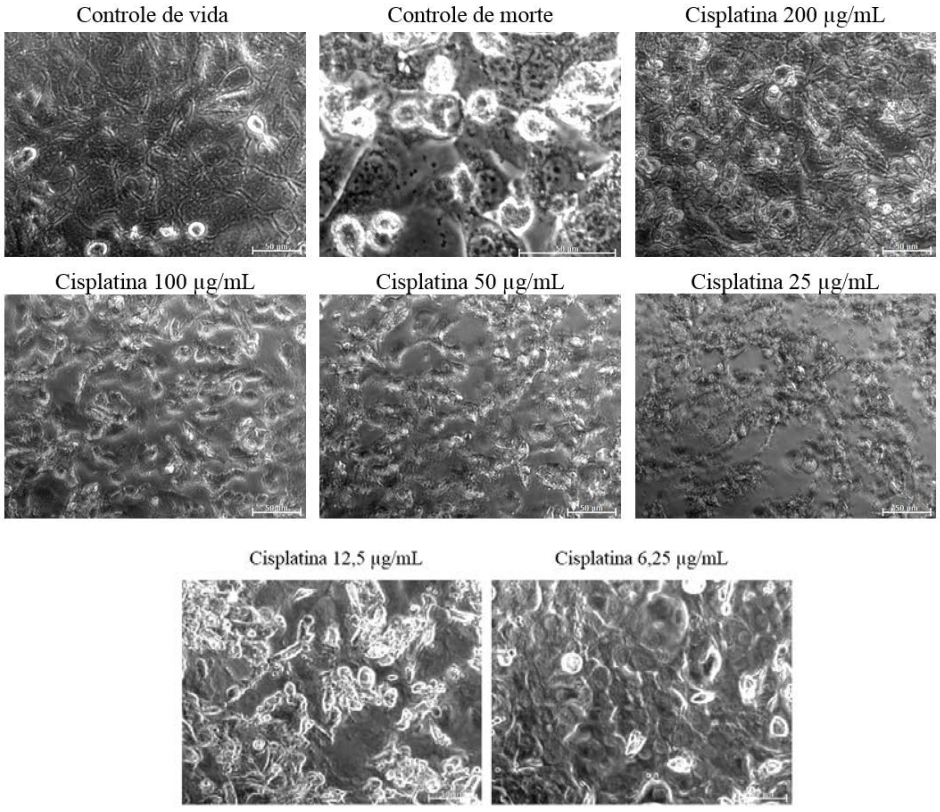


FIGURA 14. Registro da morfologia da linhagem SKOV-3 exposta à cisplatina não aquecida.

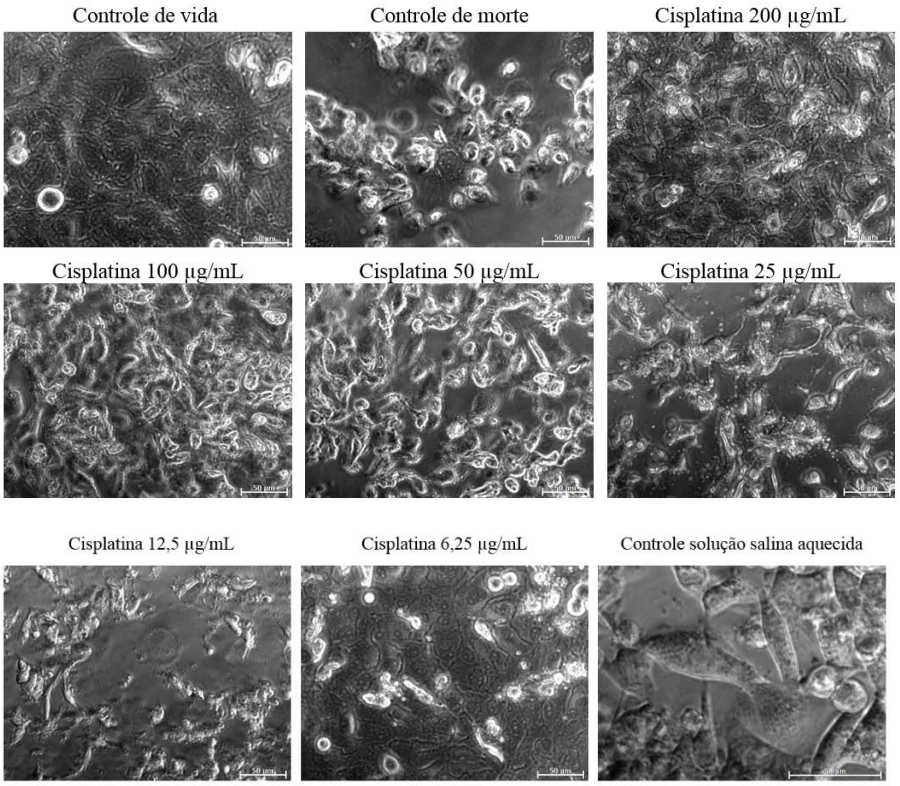


FIGURA 15. Registro da morfologia da linhagem SKOV-3 exposta à cisplatina aquecida a 41ºC.

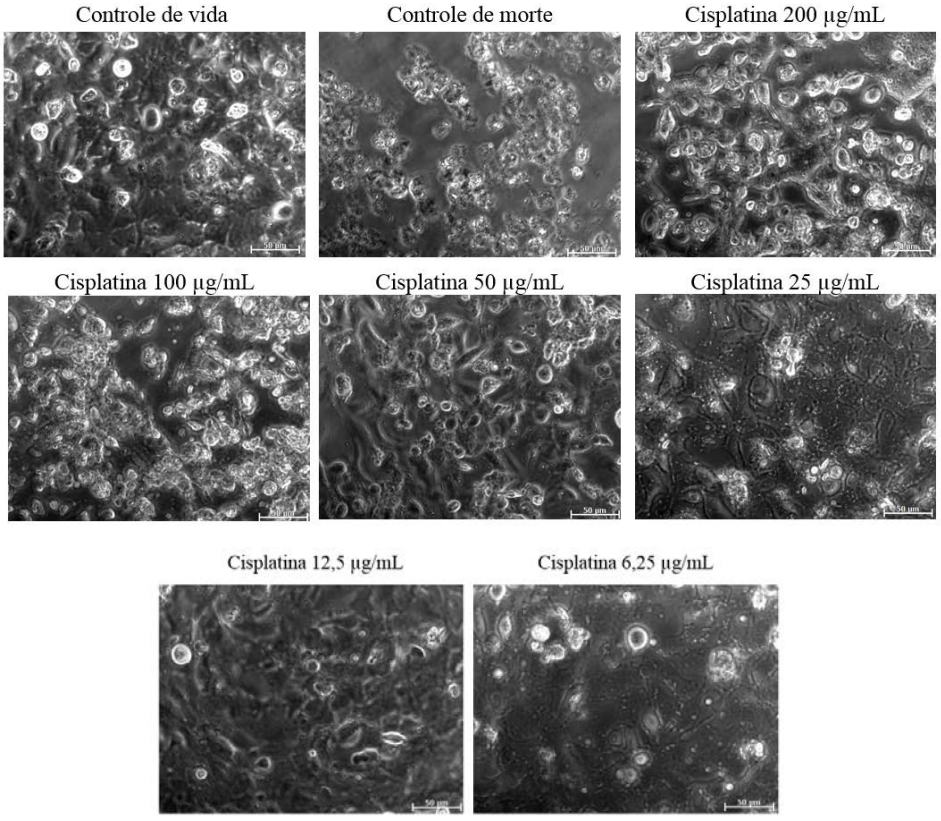


FIGURA 16. Registro da morfologia da linhagem OV-90 exposta à cisplatina não aquecida.

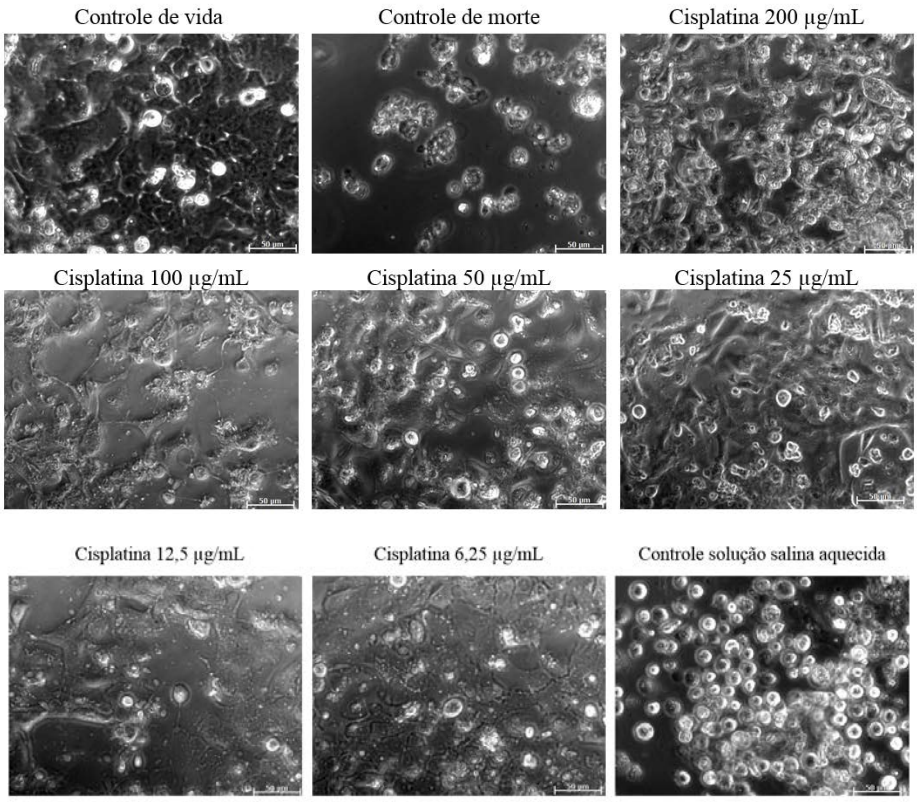


FIGURA 17. Registro da morfologia da linhagem OV-90 exposta à cisplatina aquecida a 41ºC.

5.2 Cálculo das expressões gênicas

A expressão gênica foi quantificada pelo método ΔΔCt (delta delta Ct) e a quantificação relativa (RQ) foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este método analisa as mudanças na expressão gênica da amostra tumoral para o gene de interesse em relação a amostra normal (também chamada de calibradora ou amostra de referência), considerando o controle endógeno como normalizador. Assim, é possível verificar a subexpressão ou superexpressão dos genes-alvo.[92]

5.3 Análise *in silico* da rede de interação dos genes

Análise *in sílico* da rede de interação foi realizada em banco de dados STRING[91], evidenciando interações entre as proteínas codificadas pelos genes analisados neste estudo.

O banco de dados STRING também foi usado para desenhar uma rede de enriquecimento funcional usando informações do Processo Biológico (*Gene Ontology*). Para esta análise, foram selecionados *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L*

e *HSPD1*. Os alvos selecionados mostraram relevância para os processos relacionados ao redobramento de proteínas, regulação negativa da apoptose intrínseca induzida por estresse oxidativo, troca de isotipo e interação direta entre si. Os detalhes de cada tipo de interação e processo biológico relacionado são mostrados na Figura 18.

Foi utilizado o algoritmo Gene Mania, GeneMANIA (http://www.genemania.org), uma interface web flexível e amigável para gerar hipóteses sobre a função do gene, analisar listas de genes e priorizar genes para ensaios funcionais. Dada uma lista de consulta, *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* e *HSPD1*, o algoritmo estende a lista com genes funcionalmente semelhantes que identifica usando dados genômicos e proteômicos disponíveis.

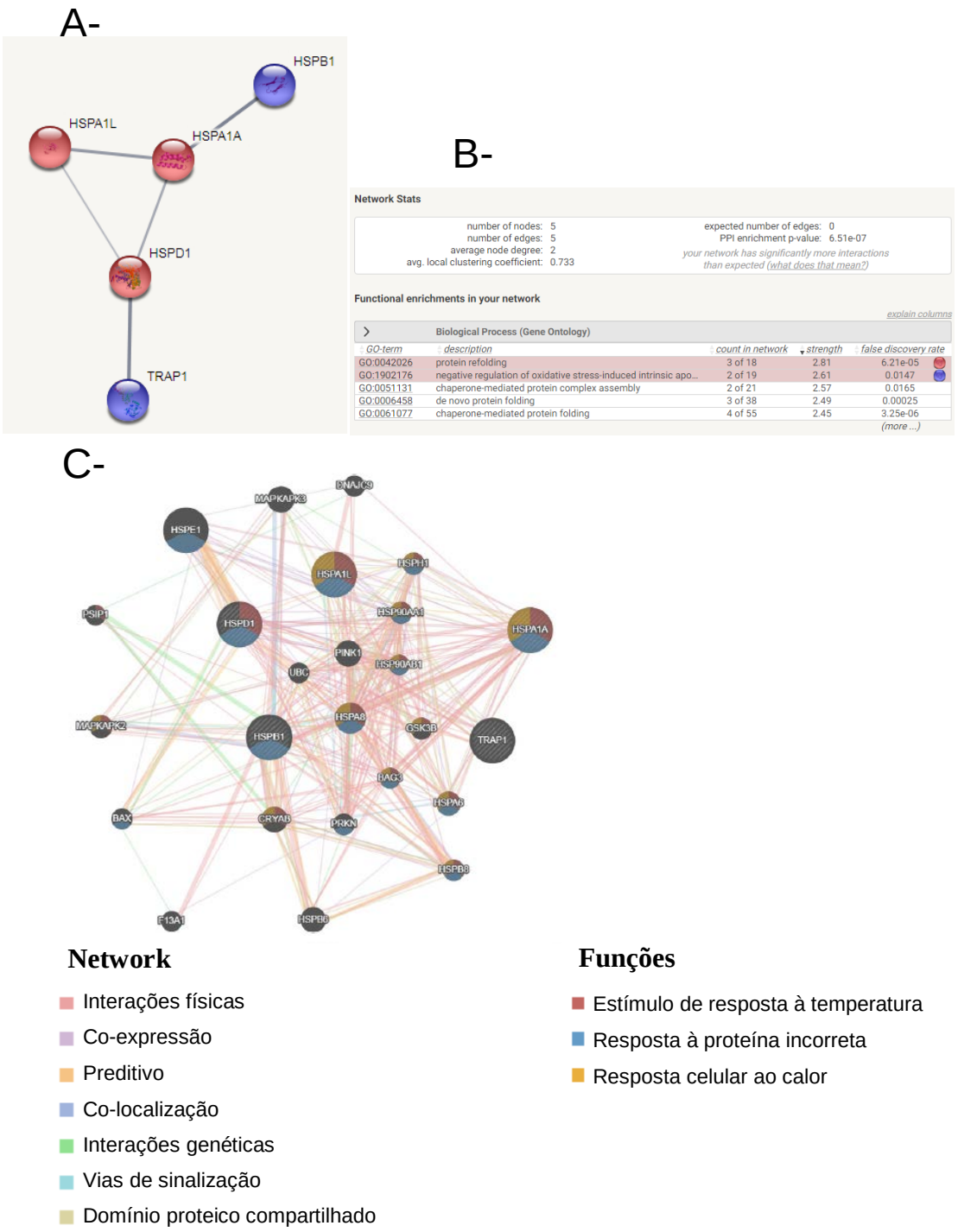


FIGURA 18. O banco de dados STRING também foi usado para desenhar uma rede de enriquecimento funcional usando informações do Processo Biológico (Ontologia Genética). A rede foi construída usando o banco de dados STRING (https://string-db.org) do Instituto Suíço de Bioinformática e do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL) A) Rede de proteínas fornecida por STRING. B) A rede de proteínas foi construída considerando os processos biológicos selecionados e identificados pelas cores indicadas. C) A rede usando o servidor de predição GeneMANIA: integração de rede biológica para priorização de genes e predição da função gênica, mostrando genes relacionados com os genes deste estudo (nós amarelos) e os outros genes (nós cinzas) são conectados por linhas de acordo com interações físicas (rosa), co-expressão (roxo), prevista (laranja).

6. Referências Bibliográficas

1. Kooeffler HP, McCormick F, Denny C. Molecular mechanisms of cancer. West J Med. 1991; 155:505-514.

2. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. Science. 2017; 355:1330-1334.

3. Youn A, Simon R. Identifying cancer driver genes in tumor genome sequencing studies. Bioinformatics.2011; 15;27(2):175-181.

4. Ali A, Bhattacharya S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. Bioorg Med Chem. 2014; 15;22(16):4506-4521

5. Lim S, Quinton RJ, Ganem NJ. Nuclear envelope rupture drives genome instability in Lin S1, Gregory RI2. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 2015; 15(6):321-333.

6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011 Mar 4; 144(5): 646–674.

7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: Cancer J Clin. 2021 May; 71(3): 209-249.

8. WHO, World Health Organization. Cancer. 2021. Access 12 Aug 2021. Avaliable in: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer.

9. INCA, Instituto Nacional do Câncer. José Alencar Gomes da Silva (2020) Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde. Access 01 April 2021. Avaliable in: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf

10. Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016; 66:7-30. 225.

11. Chan JK, Tian C, Monk BJ, Herzog T, Kapp DS, Bell J, *et al*. Gynecologic Oncology Group. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer. 2008 May 15;112(10):2202-10.

12. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. Cancer. 2003 May 15;97(10 Suppl):2631-42.

13. Kraggerud SM, *et al.* Molecular characteristics of malignant ovarian germ cell tumors and comparison with testicular counterparts: implications for pathogenesis. Endocr Rev. 2013 Jun; 34(3):339-76.

14. Horta M, Cunha TM. Sex cord-stromal tumors of the ovary: a comprehensive review and update for radiologists. Diagn Interv Radiol. 2015 Jul-Aug; 21(4):277-86.

16. Kurman RJ; Shin IeM. The origin and pathogenesis of Epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. Am J Surg Pathol. 2010 Mar; 34(3):433-43.

15. Shih IeM, *et al.* The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. Am J Pathol. 2021 Jan; 191(1):26-39.

17. Abedi SM, Mardanshahi A, Shahhosseini R, Hosseinimehr SJ. Nuclear medicine for imaging of epithelial ovarian cancer. Future Oncol. 2016 May;12(9):1165-77.

18. Pujade-Laurainea JAL, R.T. Pensonc, A.M. Ozad, J. Korache, T. Huzarskif, A. Povedag, *et al.* Treatment with olaparib monotherapy in the maintenance setting significantly improves progression-free survival in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer: Results from the phase III SOLO2 study. SGO Annual Meeting on Women's Cancer; 2017; National Harbor, MDOlaparibe estudo solo.

19. Sun C, Li N, Ding D, Weng D, Meng L, Chen G, Ma D. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. PLoS One. 2014 May 1;9(5):e95285.

20. Friedlander M, *et al*. Gynecologic Cancer InterGroup. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 2011 May;21(4):771-5.

21. FIGO, International Federation of Gynecology Obstetrics. Clinical practice guidelines; 2009.

22. Chan JK, Tian C, Monk BJ, Herzog T, Kapp DS, Bell J, Young RC; Gynecologic Oncology Group. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer. 2008 May 15;112(10):2202-10.

23. Fader AN, Rose PG. Role of surgery in ovarian carcinoma. J Clin Oncol. 2007 Jul 10;25(20):2873-83.

24. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. J Clin Oncol. 2002 Mar 1;20(5):1248-59.

25. Begossi G, Gonzalez-Moreno S, Ortega-Perez G, Fon LJ, Sugarbaker PH. Cytoreduction and intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis, sarcomatosis and mesothelioma. Eur J Surg Oncol. 2002 Feb;28(1):80-7.

26. Sugarbaker PH. New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome? Lancet Oncol. 2006 Jan;7(1):69-76.

27. Alzahrani N, Ferguson JS, Valle SJ, Liauw W, Chua T, Morris DL. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: long-term results at St George Hospital, Australia. ANZ J Surg. 2016 Nov;86(11):937-941.

28. Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, *et al.* European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Group; NCIC Clinical Trials Group. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. N Engl J Med. 2010 Sep 2;363(10):943-53.

29. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, *et al*. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. N Engl J Med. 1996 Jan 4;334(1):1-6.

30. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, *et al*. Gynecologic Oncology Group. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. J Clin Oncol. 2003 Sep 1;21(17):3194-200.

31. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, *et al*. Gynecologic Oncology Group. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. J Clin Oncol. 2003 Sep 1;21(17):3194-200.

32. du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, *et al.* Ovarian Cancer Study Group. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. J Natl Cancer Inst. 2003 Sep 3;95(17):1320-9.

33. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, *et al*. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. N Engl J Med. 2011 Dec 29;365(26):2473-83.

34. Wang Z, Zhu G. DNA Damage Repair Pathways and Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elservier. 2018 Jun 19; Access 23 May 2021.

35. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. Nature. 1969 Apr 26;222(5191):385-6.

36. Linasmita V, Pattaraarchachai J, Daengdeelert P. Prognostic factors for survival of epithelial ovarian cancer. Int J Gynaecol Obstet. 2004 Apr;85(1):66-9.

37. Fader AN, Rose PG. Role of surgery in ovarian carcinoma. J Clin Oncol. 2007 Jul 10;25(20):2873-83.

38. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene. 2003 Oct 20;22(47):7265-79.

39. Chien J, Kuang R, Landen C, Shridhar V. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. Front Oncol. 2013 Sep 24;3:251.

40. Harder B, Tian W, La Clair JJ, Tan AC, Ooi A, Chapman E*, et al*. Brusatol overcomes chemoresistance through inhibition of protein translation. Mol Carcinog. 2017 May;56(5):1493-1500.

41. Zhao J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. Pharmacol Ther. 2016 Apr;160:145-58.

42. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, *et al*. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. N Engl J Med. 2006 Jan 5;354(1):34-43.

43. Walker JL, Brady MF, Wenzel L, Fleming GF, Huang HQ, DiSilvestro PA, *et al*. Randomized Trial of Intravenous Versus Intraperitoneal Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Ovarian Carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol. 2019 Jun 1;37(16):1380-1390.

44. Lotti M, Capponi MG, Piazzalunga D, Poiasina E, Pisano M, Manfredi R, *et al*. Laparoscopic HIPEC: A bridge between open and closed-techniques. J Minim Access Surg. 2016 Jan-Mar;12(1):86-9.

45. Yan TD, Deraco M, Baratti D, Kusamura S, Elias D, Glehen O, *et al*. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: multi-institutional experience. J Clin Oncol. 2009 Dec 20;27(36):6237-42.

46. Hotouras A, Desai D, Bhan C, *et al*. Heated Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for Patients with Recurrent Ovarian Cancer: A Systematic Literature Review. International Journal of Gynecologic Cancer 2016;26:661-670.

47. Batista TP. Comment on: Surgery and HIPEC in Recurrent Epithelial Ovarian Cancer: A Prospective Randomized Phase III Study. Ann Surg Oncol. 2017 Dec;24(Suppl 3):630.

48. Koole SN, Kieffer JM, K Sikorska, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR, *et al*. Health-related quality of life after interval cytoreductive surgery with or without hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with stage III ovarian cancer. Eur J Surg Oncol. 2021 Jan;47(1):101-107.

49. Bakrin N, Bereder JM, Decullier E, Classe JM, Msika S, Lorimier G, *et al*. Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma: a French multicentre

retrospective cohort study of 566 patients. Eur J Surg Oncol. 2013 Dec;39(12):1435-43.

50. van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR, *et al*. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2018 Jan 18;378(3):230-240.

51. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, *et al*. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2018 Dec 27;379(26):2495-2505.

52. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, *et al*. PAOLA-1 Investigators. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2019 Dec 19;381(25):2416-2428.

53. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. Trends Pharmacol Sci. 2017 Mar;38(3):226-256.

54. Ritossa, F.A. New puffing pattern induced by temperature shock and DPN in Drosophila. Expirientia, 1962; 13-571-573.

55. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):15-27.

56. Saini J, Sharma PK. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. Curr Drug Targets. 2018;19(13):1478-1490.

57. Dai C, Sampson SB. HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. Trends Cell Biol. 2016 Jan;26(1):17-28.

58. Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, Chi KN. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. Nat Rev Urol. 2015 Jan;12(1):26-36.

59. Popli DB, Sircar K, Chowdhry A, Rani V. Role of heat shock proteins in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2015 Sep;159(3):366-71.

60. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones. 2005 Summer;10(2):86-103.

61. Pfister K, Radons J, Busch R, Tidball JG, Pfeifer M, Freitag L, *et al*. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. Cancer. 2007 Aug 15;110(4):926-35.

62. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):15-27.

63. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. Cell Cycle. 2006 Nov;5(22):2592-601.

64. Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway protein as targets for cancer therapy. J Clin Oncol, 2005;10:5386-5403

65. Yasuda K, Hirohashi Y, Mariya T, Murai A, Tabuchi Y, Kuroda T, *et al*. Phosphorylation of HSF1 at serine 326 residue is related to the maintenance of gynecologic cancer stem cells through expression of HSP27. Oncotarget. 2017 May 9;8(19):31540-31553.

66. Elstrand MB, Kleinberg L, Kohn EC, Tropé CG, Davidson B. Expression and clinical role of antiapoptotic proteins of the bag, heat shock, and Bcl-2 families in effusions, primary tumors, and solid metastases in ovarian carcinoma. Int J Gynecol Pathol. 2009 May;28(3):211-21.

67. Liu JR, Opipari AW, Tan L, Jiang Y, Zhang Y, Tang H, *et al*. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. Cancer Res. 2002 Feb 1;62(3):924-31. P

68. Di Veroli GY, Fornari C, Goldlust I, Mills G, Koh SB, Bramhall JL, *et al*. An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. Sci Rep. 2015 Oct 1;5:14701.

69. Cheng J, Lv Z, Weng X, Ye S, Shen K, Li M, *et al*. Hsp27 Acts as a Master Molecular Chaperone and Plays an Essential Role in Hepatocellular Carcinoma Progression. Digestion. 2015;92(4):192-202.

70. Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, Geisler HE, Miller GA, Zhou Z, *et al*. HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up. Eur J Gynaecol Oncol. 2004;25(2):165-8.

71. Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Marx D, Meden H. Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. Anticancer Res. 1998 Jul-Aug;18(4C):2967-71.

72. Darcy KM, Tian C, Reed E. A Gynecologic Oncology Group study of platinum-DNA adducts and excision repair cross-complementation group 1 expression in optimal, stage III epithelial ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy. Cancer Res. 2007 May 1;67(9):4474-81.

73. Hoter A, Naim HY. Heat Shock Proteins and Ovarian Cancer: Important Roles and Therapeutic Opportunities. Cancers (Basel). 2019 Sep 18;11(9):1389.

74. Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. J Clin Oncol. 1993 May;11(5):891-8.

75. Costantino E, Maddalena F, Calise S, Piscazzi A, Tirino V, Fersini A, *et al*. TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptotis in human colorectal carcinoma cells. Cancer Lett. 2009 Jun 28;279(1):39-46.

76. Landriscina M, Amoroso MR, Piscazzi A, Esposito F. Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. Gynecol Oncol. 2010 May;117(2):177-82.

77. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci. 2005 Mar;62(6):670-84.

78. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. Oncogene. 2004 Apr 12;23(16):2907-18.

79. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. Cell Death Differ. 2004 Apr;11(4):390-402.

80. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov 8, 627–644 (2009).

81. Liu H, Scholz C, Zang C, Schefe JH, Habbel P, Regierer AC, *et al*. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs *in vitro*. Anticancer Res. 2012 May;32(5):1627-37.

82. Zaytseva YY, Valentino JD, Pat Gulhati P, Evers M. mTOR inhibitors in cancer therapy. Cancer Letters. 2012; 319(1):1-7.

83. Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, Yee KW, Munsell MF, Ellen Jackson C, *et al*. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. Blood. 2007 Apr 15;109(8):3509-12.

84. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9.

90. Fu J, Bian L, Zhao L, Dong Z, Gao X, Luan H, Sun Y, *et al*. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2010 Aug;42(8):568-74.

91. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, *et al*. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.

92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

7. Artigo

Overexpression of heat shock genes on serous ovarian cancer cell line could be associated with poor outcomes *in vitro* model in hyperthermia

Overexpression of heat shock genes on serous ovarian cancer cell line could be associated with poor outcomes *in vitro* model in hyperthermia

Warne Pedro de Andrade[1,2]*; Luciana Maria Silva[3], Agnaldo Lopes da Silva Filho[2,4]

[1]*Núcleo de Oncologia e Hematologia – Grupo Oncoclinicas, Belo Horizonte, Brazil*

[2]*Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil*

[3]*Serviço de Biologia Celular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brazil*

[4]*Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

*Corresponding author: Warne Pedro de Andrade
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Escola de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Professor Alfredo Balena 190
30130-100. Belo Horizonte, Brasil.
E-mail address: wpedro@medicos.oncoclinicas.com (W.P. Andrade).

ABSTRACT

Introduction: Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecological malignancy, with the presence of chemoresistance contributing to the poor prognosis. Heat shock proteins are produced in response to pathophysiological stress and take part in several stages of carcinogenesis, acting primarily as anti-apoptotic agents. In an attempt to improve oncological results, new therapeutic approaches such as intraperitoneal chemotherapy and HIPEC have been proposed in recent studies with gains in overall survival (OS). However, some questions have not yet been answered. Our objectives were to determine the sensitivity of ovarian cancer cell lines (TOV-21G, SKOV-3, and OV-90) to cisplatin and PBS (saline) in 37°C and 41°C. In addition, we aimed to evaluate the expression profile of *TRAP1, HSPB1, HSPA1A* and *HSPA1L* genes and their participation in the resistance, and whether the use of everolimus inhibiting the mTOR pathway could improve outcomes in treated groups. **Methods**: cultures of ovarian cancer cells TOV-21G (clear cell carcinoma), SKOV-3 (platinum-resistant serous carcinoma), and OV-90 (high-grade serous). Cell cytotoxicity (MTT) assay was performed. The ovarian cancer cells lines were treated with cisplatin in normothermia (37ºC) and cisplatin in hyperthermia (41ºC) and a control group treated with PBS saline solution at 37 and 41ºC for 24 hours, followed by new supplementation and a new 3-hours incubation. A clonogenic assay was performed. Then they were submitted to RNA extraction and reverse transcription. qRT-PCR was performed to compare the expression of *TRAP1, HSPB1, HSPD1, HSPA1A* and *HSPA1L* in different treatments. .**Results**: There was no statistical difference concerning cytotoxicity between treatment with heated cisplatin and treatment with normothermia. It was not possible to evaluate the expression of the heat shock genes in the SKOV-3 cell lines. The *HSPB1, HSPD1* and *TRAP1* genes were positively regulated in OV-90 submitted to hyperthermia in relation to normothermia, and there were no significant changes in expression in the TOV-21G. **Conclusion**: we observed that OV-90 serous ovarian cancer cell line, after heated cisplatin treated had the *HSPA1A*, *TRAP1,* and *HSPB1* heat shock genes upregulated. The *HSPB1* genes had the most significant value expression. Our result showed that the heat shock genes could be related at chemotherapy resistance phenotyping found this tumor-like. The use of everolimus has the potential to sensitize the cytotoxicity in a model using heated cisplatin and this improved our results Thus, it is necessary to evaluate these genes in a clinical study

by HIPEC.

Keywords: ovarian cancer, HIPEC, prognosis, resistance to chemotherapy, heat shock proteins.

1. Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) has the highest mortality rate among gynecological neoplasm and causes around 125,000 deaths globally per year. In the US alone, an estimated 22,000 women will be diagnosed in 2021, with over 13,000 dying of the disease, considered the most lethal gynecological malignancy in women worldwide [1]. Nowadays, about 70 percent of women with ovarian cancer (OC) are diagnosed at an advanced stage (stages III/IV). The high mortality rates of EOC are basically due to the inefficient detection early. Unfortunately, symptoms are usually absent in the early stages, and signs are nonspecific [2-3].

The treatment for EOC involves maximal cytorreductive surgery followed by platinum-based chemotherapy. The combination of carboplatin and paclitaxel is considered the gold standard. However, the main challenge in treating this disease is that despite high initial response rates to chemotherapy of approximately 80%, most women with advanced OC relapse within two years [4]. Moreover, new drugs have been incorporated for the treatment of recurrent EOC and for adjuvant and maintenance treatment, such as agents directed at angiogenesis such as the monoclonal antibody bevacizumab, which binds to the human vascular endothelial growth factor (VEGF) and the PARP inhibitors that prevents a DNA repair and leads to the cell to synthetic lethality, as demonstrated in the SOLO 1 study [5-6]. About 70% of these patients have pelvic and peritoneal recurrences. This cancer frequently relapses with a drug-resistant phenotype, with peritoneal metastasis being the leading cause of death [7-8].

Therefore, new treatments were developed in an attempt to improve the results. Intraperitoneal chemotherapy (IP) consists of administering normothermic chemotherapy (cisplatin) into the peritoneal cavity through a portcath and treatment with HIPEC (Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy), which consists of using cisplatin heated to 41-43ºC infused through a machine in the peritoneal cavity. After performing cytoreduction, taking into account that heat can increase the penetration of cisplatin in microscopic disease, a factor that would be limiting in IP [9]. Being evidenced gain of global survival with the use of HIPEC, however, there are questions still unanswered about these treatments, such as there is a molecular profile that could better respond to HIPEC or what the best chemotherapy used if it is possible to improve the results of HIPEC [10].

Currently, there is an interest in finding specific molecular markers that function both in the prognosis of the disease and the patient's response to HIPEC. Good candidates include the Heat Shock Proteins (HSP) family and their genes [9,10]. In this context, heat shock genes and their proteins are promising targets. These evolutionarily conserved proteins are classified according to their molecular weight, are grouped into four main classes: HSP27 (*HSPB1*), HSP60 (*HSPD1*), HSP70 (*HSPA1A*-*HSPA1L*), and HSP901L (*TRAP 1*) [11-12, 43].

Although the existing data for HSP function in OC progression and drug resistance is appealing, it is still limited and conflicting at times. For instance, the cytosolic *HSPB1* (HSP27), HSP70 (*HSPA1A*, *HSPA1L*) and HSP90 (*TRAP1*) as well as the mitochondrial HSP60 proteins and the tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (*TRAP-1*) have all been shown to be induced by drug treatment and frequently associated with cross-resistance to anticancer compounds of different classes in ovarian and other cancer types [13-14-15]. However, no previous clinical study correlated HSP or their genes in HIPEC. The pathways of heat shock genes need to be best understood by the EOC concerning a HIPEC, as there is a rationale between exposure to heat and the production of heat shock proteins.

Thus, drug-mediated regulation and hyperthermia in EOC may follow differentially controlled stress signaling pathways. Due to our limited understanding of HSP role in EOC biology in HIPEC trials, studies elucidating their potential to help the prognostic and evolutionary predictive response of patients underwent response to HIPEC and a procedural technique still restricted to some centers. The *in vitro* study was proposed to answer some questions and translate these data from the laboratory bench to clinical [16]. Then, our objectives were to determine the sensitivity of ovarian cancer cell lines (TOV-21G, SKOV-3 and OV-90) to cisplatin and PBS (saline) in 37°C and 41°C. In addition, we aimed to evaluate the expression profile of *TRAP1, HSPB1, HSPA1A* and *HSPA1L* genes and their participation in the resistance and susceptibility mechanism tumor cell lines in heat cisplatin *in vitro* model and whether the use of everolimus inhibiting the mTOR pathway could improve outcomes in treated groups.

2. Methods

2.1 Cell culture

TOV-21G, ovarian clear cell carcinoma (Cat. #CRL-11730™), SKOV-3, platinum-resistant adenocarcinoma (Cat. #HTB-77™) and OV-90, high-grade serous adenocarcinoma (Cat. #CRL-11732™) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and propagated in monolayer (culture adherent), respectively, in DMEM (Sigma, Cat. #12100-038) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma, Cat. #210115-K) and 1% de L-glutamine 0,2 M, 1% non-essential amino acids (Sigma Cat. #M7145), D-glucose (Sigma Cat. #G7021) and 1% sodium pyruvate (Sigma Cat. #P2256). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO_2. The experiments were carried out obeying a certain passage number.

2.2 Cell Survival analysis (MTT assay)

Cell viability in the presence of cisplatin and saline was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide method (MTT), according to Mitchell *et al.* [1ref]. Cells were plated in 96-well cell culture plates, TOV-21G ($2x10^4$ cells), SKOV-3 ($2,5x10^4$ cells), and OV-90 ($5x10^4$) cell in triplicate and incubated for 24 hours at 37 degrees Celsius (normothermia) and 41ºC (hyperthermia). After 24 hours, the wells were washed with 1x PBS, and the cells were treated with varying concentrations of cisplatin. The control group cell lines were also treated with saline 37°C (normothermia) and saline 41°C (hyperthermia), respectively. Untreated and treated cells with hydrogen peroxide were used as negative and positive controls, respectively. After 24h, MTT solution was added to the plate (0,5 mg/mL final concentration), the cells were incubated for 3 hours, and the absorbance measurement was performed on a spectrophotometer (SpectraMax® M5e) at 550 nM. The individual survival of the treated cells was calculated by dividing the absorbance value of the treated cells by the mean of the life control multiplying by 100. The concentration of cisplatin 37°C and 41°C that inhibited the viability of 50% of the cells (IC_{50}) from each cell line was calculated using Dr Fit version 1.042 software.

2.3 Analysis of solubilization of everolimus and certain cells in cell analysis in different types of everolimus (MTT assay)

Everolimus (molecular weight: 958,224 g/mol) was resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) all assays the final concentration of 1 mM and for all assays the final concentration of 20 nM, 18 nM, 10 nM, 5 nM and 1 nM was used for treatment of OV-90 cell lines for 24 hours. After treatment with everolimus, the cells were washed with PBS saline and again treated with cisplatin at 37ºC at a concentration of 65.7 µg/mL and with cisplatin at 41ºC at a concentration of 53.46 µg/mL whose IC_{50} had already been determined. After 24 hours the plate was washed with PBS and MTT (0.5mg/ml) was added.

2.4 Clonogenic assay

For this test, the method previously described by Franken [14] was used. TOV-21G, SKOV-3 ($1,5x10^3$ cells) cell lines, treated with cisplatin 37°C and 41°C and the other group with saline 37°C and 41°C, were seeded on culture disks of 60 mm diameter in triplicate. Only colonies with 50 or more cells were counted. The plating efficiency (PE) was determined by dividing the mean number of colonies of the controls by the number of plated cells. The surviving fraction (SF) was calculated by dividing the mean of colonies formed after treatment by the number of plated cells and multiplying the result by PE. This result was multiplied by 100%. Colonies were analyzed with DAPI and phalloidin probes [17].

2.5 RNA extraction, cDNA synthesis, and gene expression analysis

According to the manufacture's instructions, total RNA was extracted from 50-100 mg of each ovarian tumor sample using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA yield and A260/280 ratio were determined by a NanovueTM Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life, USA). RNA integrity and quality were characterized through 1% agarose gel electrophoresis. Subsequently, the samples were treated with RNAse-Free DNAse Set® (Qiagen) to remove possible traces of genomic DNA.

According to the manufacturer's recommendations, cDNA was synthesized using M-MLV Reverse transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The qRT-PCR was performed using Inventoried assays (TaqMan® Assays - Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendation. TATA Binding Protein (TBP) was used as endogenous control. Each 40-cycle reaction was performed in duplicate. A sample without a template was included as a control in each assay. Relative gene expression was determined using the 2-ΔΔCq method [18]. Two technical replicates were adopted for each sample.

2.6 Gene functional and Network pathway analysis

The interactions between the proteins encoded by the differentially expressed HSP genes were evaluated *in silico* by the freely available STRING and GeneMania database [19] to identify the categories of genetic ontology and/or paths that can be overrepresented.

2.7 Statistical Analysis

For the statistical analysis for the other assays, we used the SPSS 19 software (IBM). To analyze of difference between groups, the univariate analysis (ANOVA) was used and for the analysis of multiple comparisons, Post Hoc by the DMS method (minimum significant difference) was adopted. Non-parametric tests were performed by Kruskal-Wallis. The level of significance adopted was 5% (p-value < 0.05) [20-21].

3. Results

Figure 1 shows a photomicrograph of the strains used in this study cultivated in a monolayer *in vitro* model.

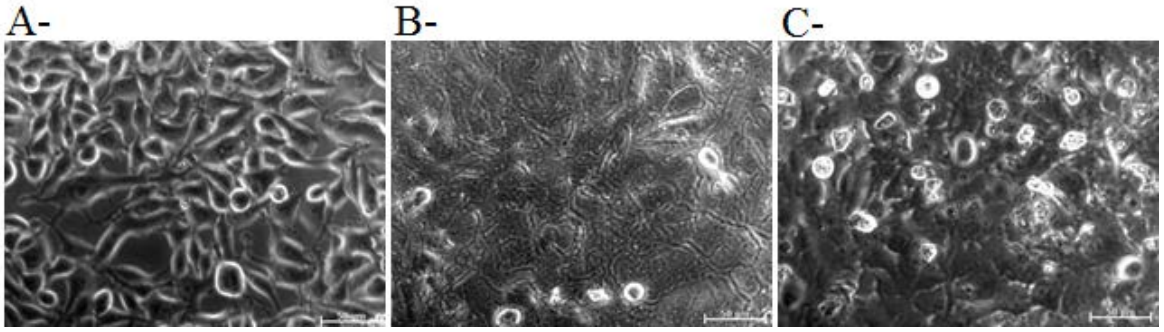


Figure 1. TOV-21G (A), SKOV-3 (B) and OV-90 (C) ovarian cancer cell lines. Photomicrograph of the strains used cultivated in a monolayer *in vitro* in this study.

The cytotoxic effect of heated and unheated cisplatin on SKOV-3, TOV-21G, and OV-90 cell lines was demonstrated in cell viability assays using the MTT reagent. Cisplatin concentrations used ranged from 6.25 µg/mL to 400 µg/mL (Figure 2). All assay tests were performed in triplicate. The results showed that the increase in drug concentration proportionally affected cell viability, demonstrating a concentration-response effect in all assays performed (Figure 2 and 3). Figure 3 shows the analysis of variance between groups considering heated and unheated cisplatin, and it is possible to verify that there was no significant difference in viability between groups. However, the loss of cell survival at the different concentrations tested is significant.

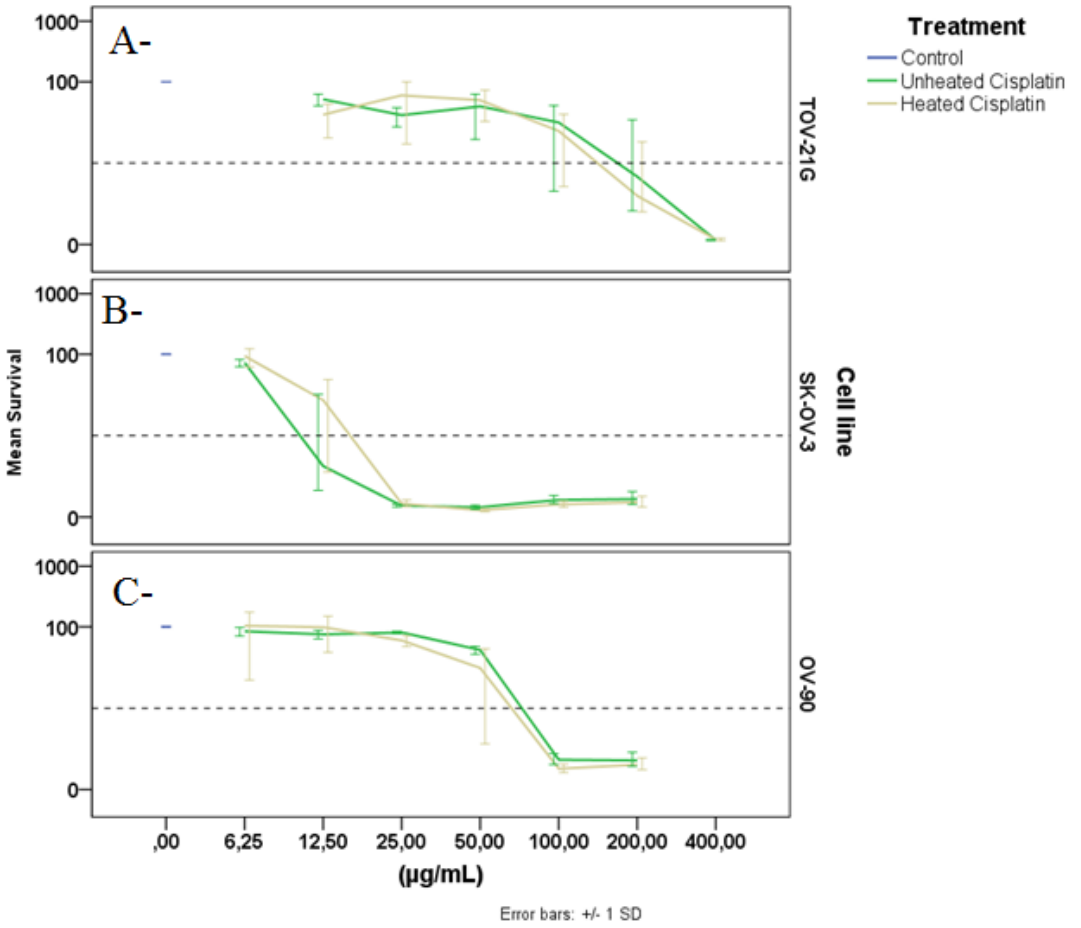


Figure 2. Cell Survival of TOV-21G (A), SKOV-3 (B) and OV-90 (C) ovarian cancer cell lines (n=3).

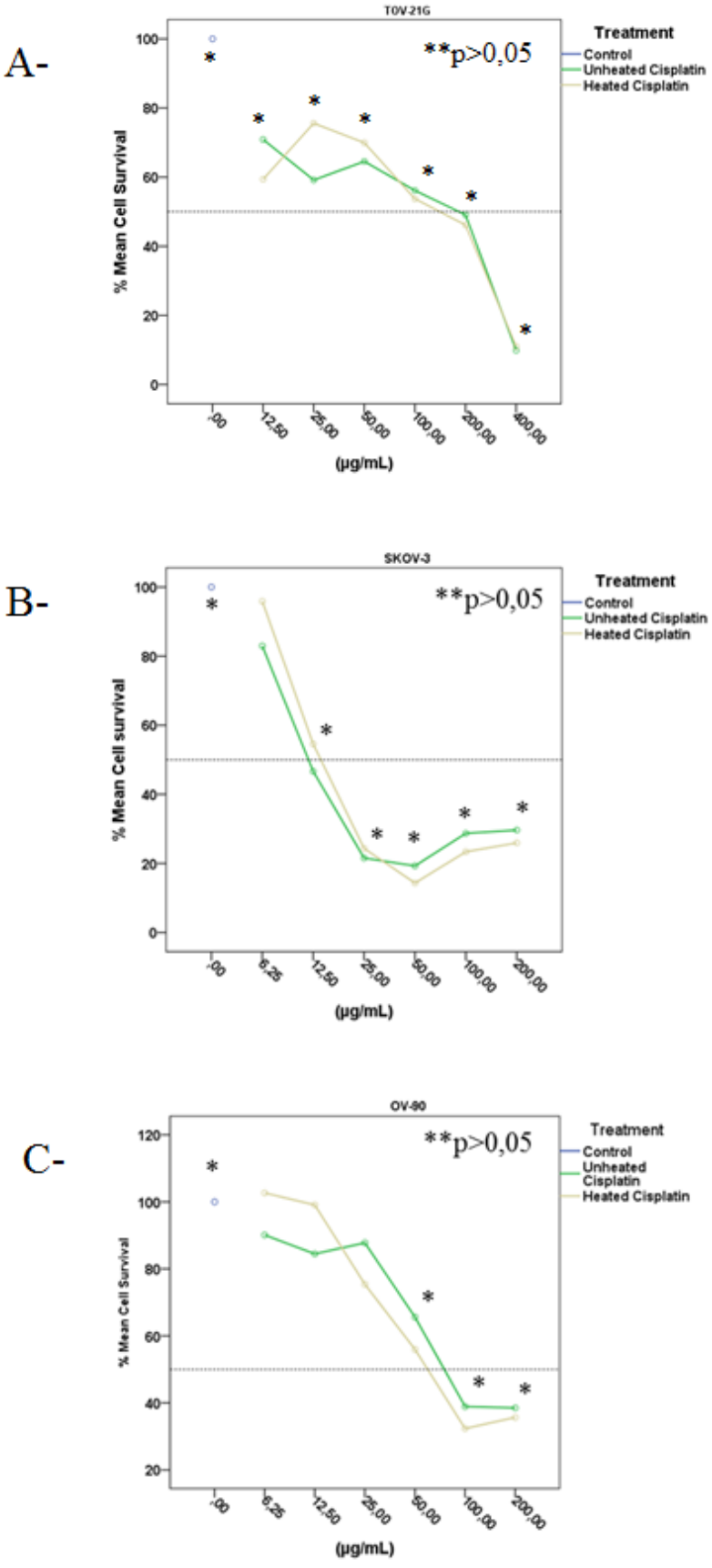


Figure 3. TOV-21G (A), SKOV-3 (B), and OV-90 (C) ovarian cancer cell lines (n=3). *Significantly different ($p<0.05$) between concentrations and **Significantly different ($p<0.05$), comparing unheated and heated cisplatin treatment. Two-way ANOVA, post hoc, DMS method.

The cytotoxic effect of heated and unheated cisplatin on SKOV-3, TOV-21G, and OV-90 cell lineages was demonstrated in cell structural analysis by inverted microscopy. Cisplatin concentrations used ranged from 12.5 µg/mL to 200 µg/mL (Figure 4).

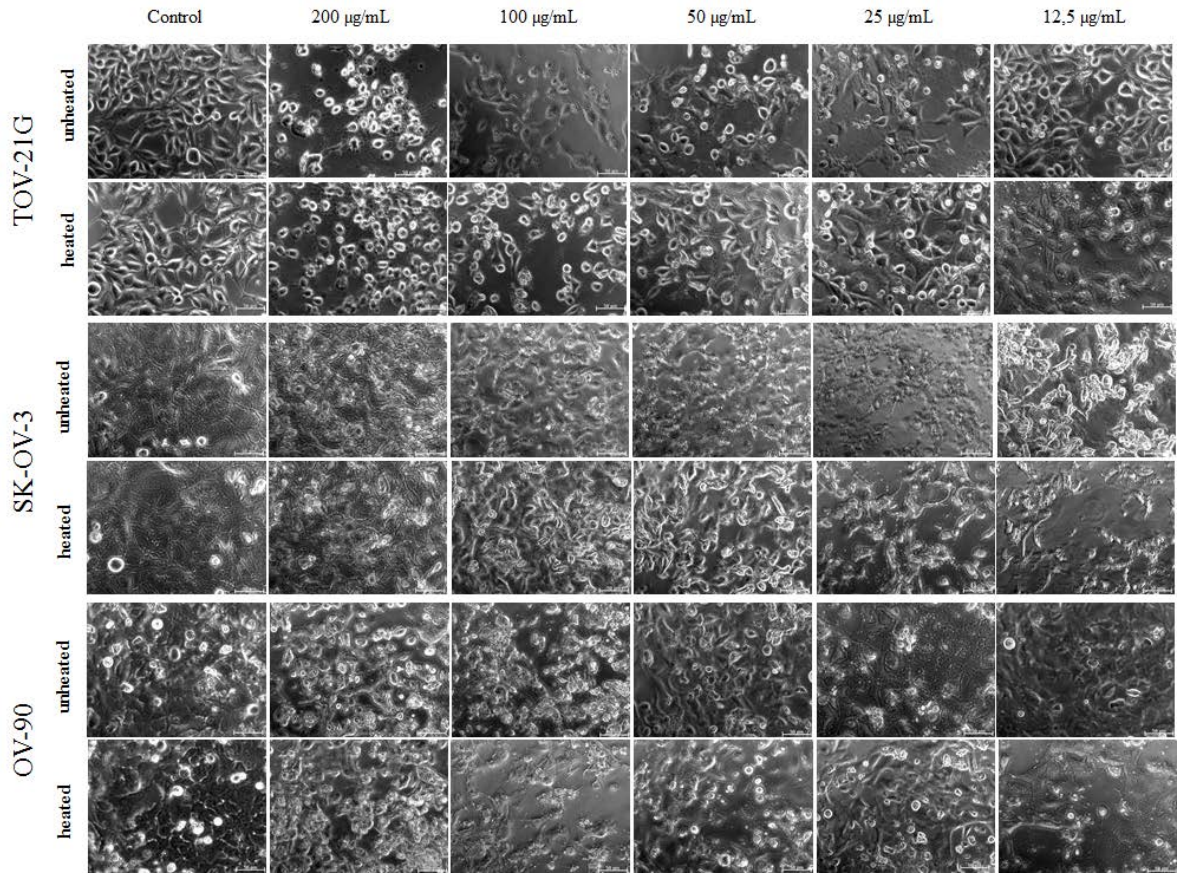


Figure 4. TOV-21G, SKOV-3, and OV-90 ovarian cancer cell lines growing as monolayer and treated with cisplatin heated (41ºC) and unheated (37ºC). SKOV-3 cell lines have presented higher structural damage under both treatments.

The survival values obtained were entered into the Dr Fit statistical program, and the IC_{50} for each assay was calculated individually (Figure 5). The IC_{50} obtained for the unheated cisplatin TOV-21G strain was 158 µg/mL and heated 138.06 µg/mL; for the SKOV-3 strain, it was unheated cisplatin 12.2 µg/mL and heated cisplatin of 13.83 µg/mL, and for the OV-90 strain, it was unheated cisplatin 65.7 µg/mL and heated cisplatin of 53.46 µg/mL.

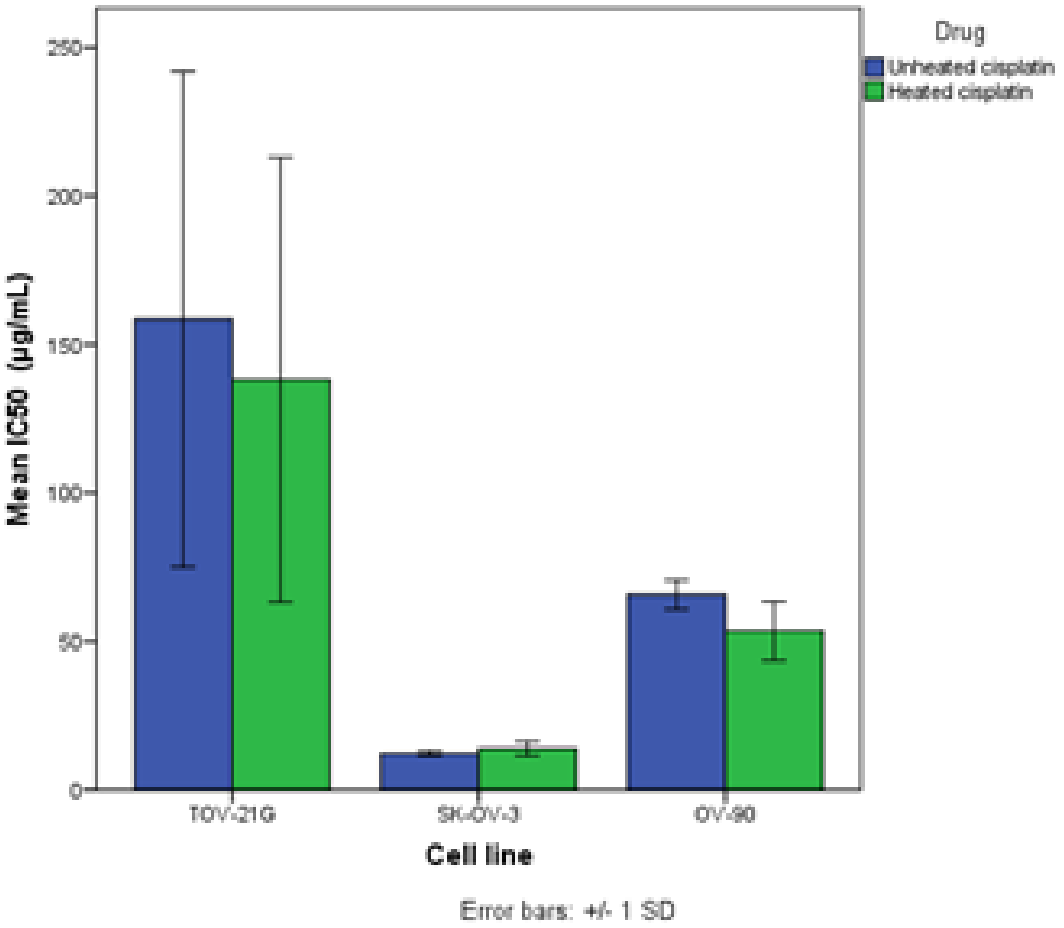


Figure 5. IC_{50} of OV-90 (A), SKOV-3 (B) and TOV-21G (C) ovarian cancer cell lines (n =3). Significantly different ($p<0.05$) comparing unheated and heated cisplatin treatment. Two-way ANOVA, post hoc, DMS method.

It was impossible to evaluate the survival fraction values obtained by the clonogenic assay because the dying cells lost adhesion in no lineage after treatment with heated and unheated cisplatin. It was only possible to obtain SF for the medium and PBS control groups. Unexpectedly, unheated PBS caused a drastic reduction in the survival fraction for SKOV-3 and warmed PBS for TOV-21G (Figure.6).

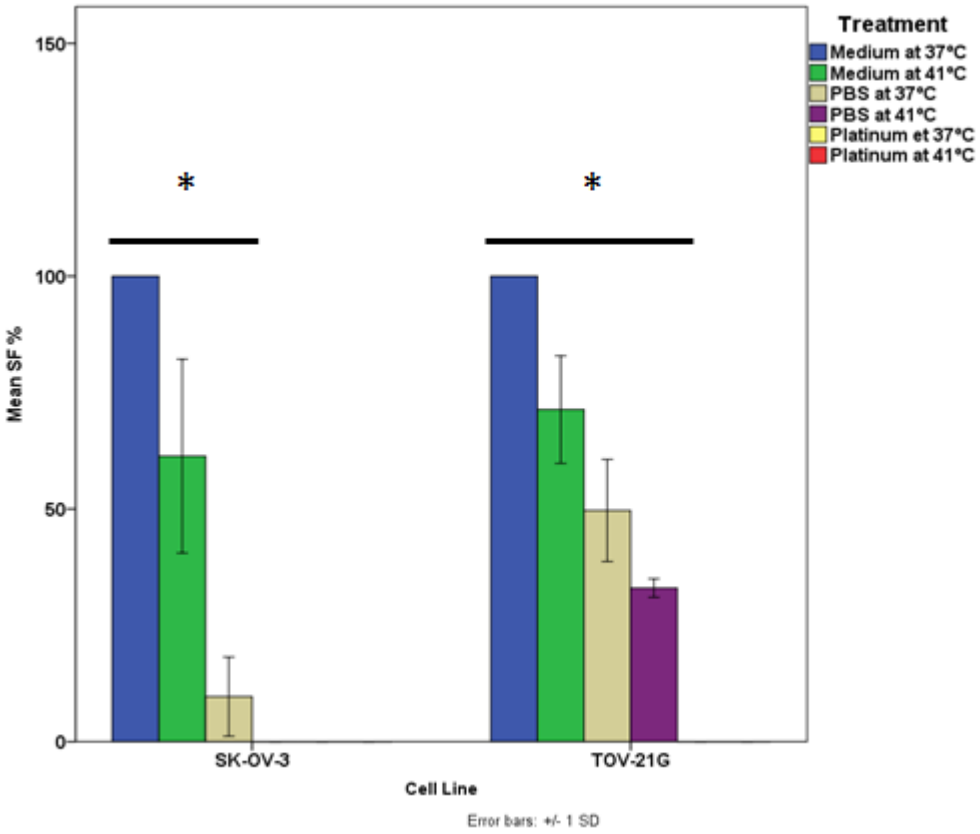


Figure 6. Cell growth inhibition exerted by platinum heated and unheated in TOV-21G and SKOV-3 cell lines (n=2), as evaluated by the clonogenic assay.
One asterisk (*) indicates a significant difference (ANOVA post hoc, $p < 0.05$).

The expression of genes *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* and *HSPD1* in ovarian cancer strains was evaluated after heated and unheated cisplatin exposure using the RT-qPCR technique (Figure 7). It was not possible to obtain expression data for the SKOV-3 lineage, as the cells remaining after treatment with IC_{50} did not have enough material and integrity to analyze the gene expression profile. The OV-90 strain showed to be sensitive to treatment with heated cisplatin, with upregulation of the *HSPB1, TRAP1* genes, and lower expression of the *HSPA1A* gene when comparing unheated and heated cisplatin.

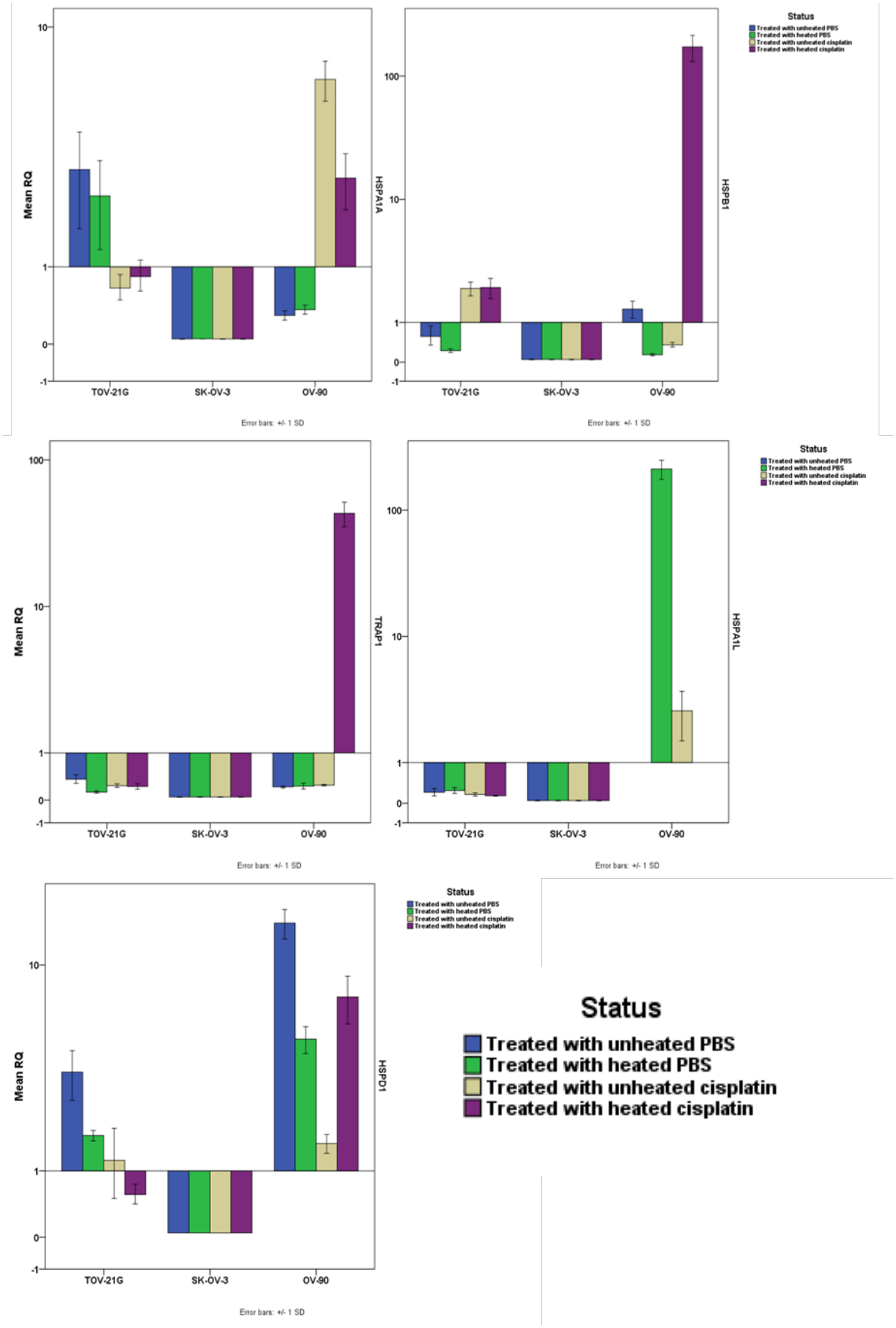


Figure 7 - Relative expression (2-ΔΔCT method) comparison between platinum heated and unheated TOV-21G and OV-90 cells (n=2). One asterisk (*) indicates a significant difference within groups (ANOVA post hoc, p <0.05).

The effect of everolimus sensitization on the cytotoxic effect of heated and unheated cisplatin on the OV-90 cell line was developed in cell viability assays using the MTT reagent. The everolimus options were 1.5, 10, 18 and 20 nM everolimus and cisplatin was 53.46 µg/mL and 65.7 µg/mL (Figure 8). All tests were performed in triplicate. The results showed that all everolimus options were able to promote the loss of cell viability when treated with heated cisplatin, demonstrating that there was a sensitization effect (Figure 2).

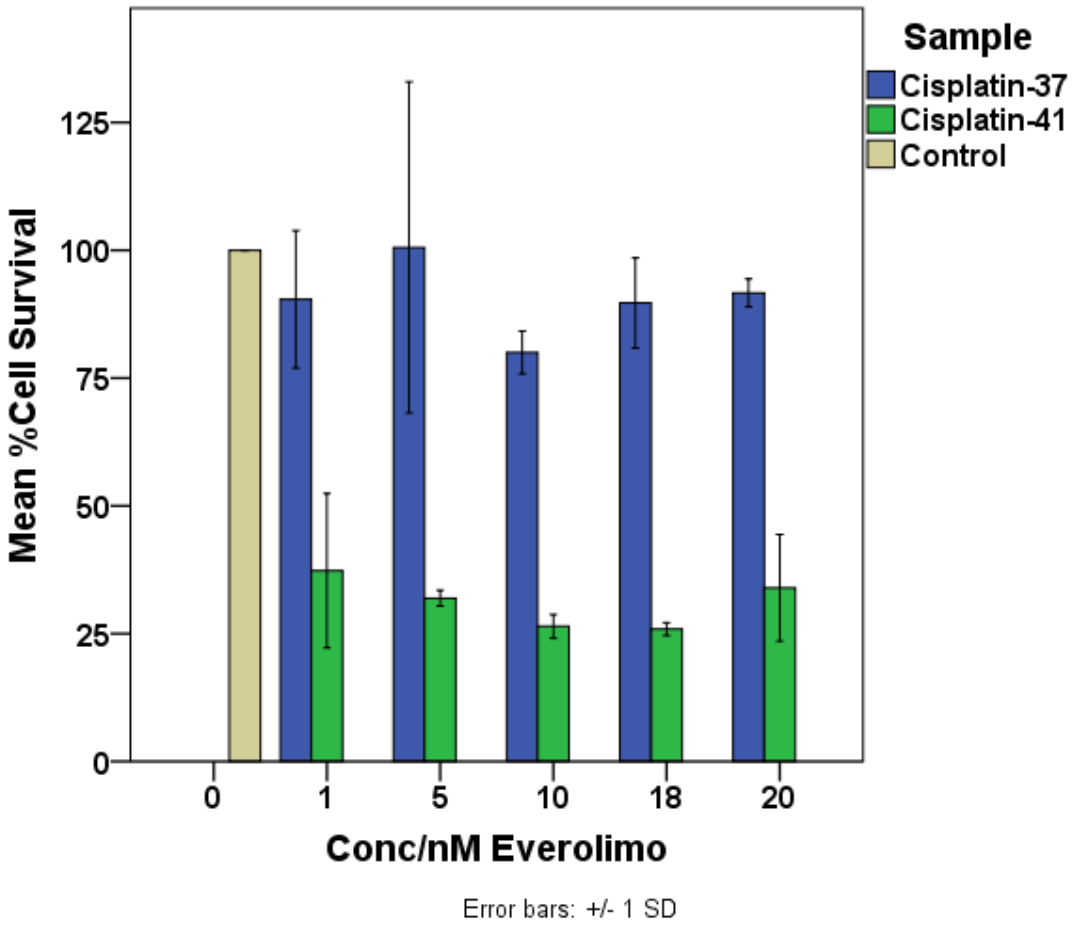


Figure 8. Cell Survival of TOV-21G (A), SKOV-3 (B) and OV-90 (C) ovarian cancer cell lines (n=3) sensing by everolimus followed at cisplatin treated.

Network pathway analysis

The STRING database was also used to draw a functional enrichment network using Biological Process (Gene Ontology) information. For this analysis, *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* and *HSPD1* were selected. Selected targets showed relevance to processes related to protein refolding, negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptosis, isotype switching, and interact directly with each other. The details of each type of interaction and related biological process are shown in Figures 9 A and B.

The Gene Mania algorithm, GeneMANIA [45], a flexible, user-friendly web interface for generating hypotheses about gene function, analyzing gene lists, and prioritizing genes for functional assays, was used. Given a query list, *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* and *HSPD1* and the algorithm extends the list with functionally similar genes that it identifies using available genomics and proteomics data (Figure 9C).

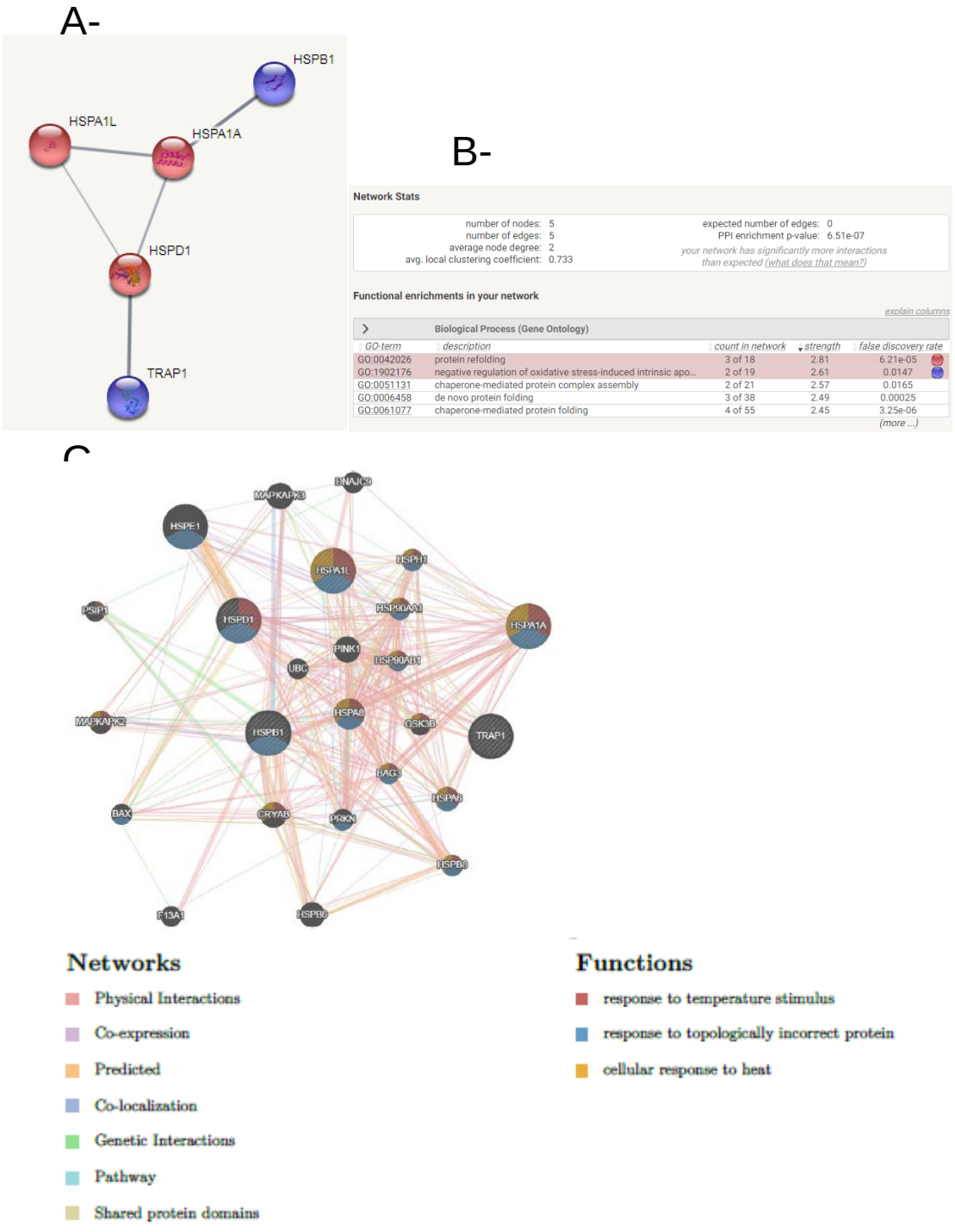


Figure 9. The STRING database was also used to draw a functional enrichment network using Biological Process (Gene Ontology) information. The network was built using the STRING database (https://string-db.org) from the Swiss Institute of Bioinformatics and the European Molecular Biology Laboratory (EMBL)A) Protein network provided by STRING. B) The protein network was constructed considering the selected biological processes identified by the indicated colors. C- The network using The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function, showing related genes with genes of this study (yellow nodes) and the other genes (gray nodes) are connected by lines according to physical interactions (pink), co-expression (fuchsia), predicted (orange).

4. Discussion

In the present study, we established an *in vitro* model mimicking the conditions of HIPEC. Using this model, it was possible to evaluate ovarian cancer cell lineages' cytotoxicity response and survival. Moreover, we assessed the level of expression of the heat shock genes *TRAP1, HSPD1, HSPB1, HSPA1A and, HSPA1L* genes in different treatments and conditions. we used platinum-resistant serous carcinoma cell lines (SKOV-3) derived from a peritoneal metastasis with a mutation in P53 representing type II tumor, TOV-21G clear cell carcinoma (primary tumor grade III, stage III that show mutations in KRAS and PI3K and OV-90 (platinum-sensitive serous carcinoma derived from peritoneal metastasis) as EOC models to study the effect of hyperthermia *in vitro* model.

The changes observed in the morphology of the different strains are related to the action of cisplatin associated with hyperthermia. However, regarding the survival curve analysis, we observed that there was no statistically significant difference between the treated groups. A group treated with cisplatin heated (hyperthermia) (41°C) was used, and another group treated with cisplatin unheated (normothermia) (37°C) mimicking unheated intraperitoneal (IP) chemotherapy and the control group treated with PBS at 37°C and 41°C was also used for these analysis degrees in different lineages. However, regarding the IC_{50} for SKOV-3 treated with heated cisplatin, we did not observe any difference in the dose-response curve, which is explained by its intrinsic resistance to platinum

Considering that EOC is a very heterogeneous disease and the most lethal gynecological one and that peritoneal metastasis is the final outcome that leads to death, every effort is needed to understand better its sensitivity and molecular pathways associated with new treatments [22-23-24].

HIPEC in ovarian cancer represents a promising new therapy but still with many challenges. It is currently used in the platinum-sensitive EOC scenario. However, there are several ongoing studies in the context of secondary debulking. During HIPEC, hyperthermic conditions within the abdominal cavity range from 41 to 43ºC depending on the protocol used HIPEC [25]. However, these protocols were defined, considering the hypothesis that hyperthermia increases the penetration of drugs such as cisplatin into tumor cells. In addition to allowing higher concentrations of cytotoxic

agents to reach tissues when compared to the systemic treatment. And they also allow for less systemic absorption which contributes to less toxicity to other tissues [25-26].

The effect of hyperthermia, considering perfusion and oxygenation, was detected in both cancerous and normal tissues. Although perfusion is increased by hyperthermia in normal tissues, opposite observations have been made in tumor tissues with reduced perfusion, leading to hypoxia in the tumor cells. Furthermore, there is damage to the DNA, cytoskeleton, and protein production [27]. In this context, there is a rationale for the involvement of heat shock proteins and the regulation of their genes and their involvement in response to treatment with HIPEC [16].

Regarding the TOV-21G cell lines, we also did not observe differences between groups. The explanation for this finding is the fact that clear cell tumors do not respond well to chemotherapy with cisplatin, being resistant [28]. And even hyperthermia, as observed, failed to sensitize the response. Regarding the SKOV-3 cell line, which is primarily resistant to platinum due to existing mutations, it was possible to understand the fact that we did not observe an increased cytotoxicity response, and therefore, there were no differences concerning survival [29].

In the OV-90 cell lines, which are described as sensitive to platinum, we expected more significant cytotoxicity with the use of cisplatin and hyperthermia when compared to the treatment of normothermia, giving consideration the fact that hyperthermia could potentialize the effect of cisplatin, which was not observed. In the clonogenic assay, it was possible to observe differences only when comparing the use of heated PBS, showing that hyperthermia can lead to cytotoxic effects. The treatment with cisplatin alters cell adhesion and therefore the assay in this treatment group cannot be performed [30-31]. In the clinical OVpec study, a more robust phase III study that evaluated 245 patients with EOC in stage III and IV, the patients were randomized to two arms with HIPEC or without HIPEC and received three additional cycles after the procedure with carboplatin and paclitaxel [10]. The data analysis from this study at a median follow-up of 4.7 years showed that patients who received HIPEC achieved a recurrence-free survival gain of 14.2 months *versus* 10.7 months and the benefit of an overall survival gain of 45.7 months *versus* 33.9 months. This study used 100 mg/m^2 cisplatin [10].

Therefore, data observed in our studies represent the findings similar to clinical studies. The HIPEC and IP results are very similar in terms of disease-free survival and overall survival. In response to heat stress HSP family proteins are expressed by

the damage caused by hyperthermia [32-33]. The heat shock genes and their transcripts were conserved throughout evolution, whose cells induced cellular expression in various stress situations. Some of these genes in conditions of hyperthermia, hypoxia, inflammation, heavy metals, and cancer itself, can be upregulated [34]. The members of HPS are mainly regulated by a process called heat shock response and involve the heat shock factor (HSF1). The transcription of HPS genes is regulated by the heat shock factor that ensures transcriptional activation during cellular stress and deactivates after its recovery. HSF1 seems to remain constitutively active in malignant cells, indicating the presence of chronic proteotoxic stress [15]. It was shown that HSF1 separates from HSP and forms a trimer that goes to the nucleus cell and binds to the heat shock element (HSE), the promoter region of HSP. At the moment when this link occurs between HSF1 and HSE, the transcription of genes that encode the three main families HSP induced by stress in cancer occurs *HSPB1* (HSP27), *HSP1L* (HSP70), *TRAP1* (HSP90L) [35]. HSF1 is activated by hyperthermia [36]. Heat shock proteins act as chaperones of other proteins that directly modulate apoptosis signaling pathways, but they have a dual role in apoptosis, promoting or neutralizing cell death. Among the anti-apoptotic events is the blocking of cytochrome C, and they also antagonize caspase 3 and 9 [37-38].

Regarding the analysis of gene expression in different strains, a very heterogeneous transcriptional activity was observed. In the case of SKOV-3, the genes were downregulated for all treatments. Regarding the OV-90 lineage, a lineage that most represents the profile of platinum-sensitive cells, the gene expression profile was heterogeneous, but it demonstrated a profile of up-regulated genes whose transcribed proteins are related to a worse prognosis in ovarian cancer [39].

In this sense, an upregulation of the *HSPB1, TRAP1, HSPD1* genes were observed in the heated cisplatin (hypethermia) group. This result may explain the non-superiority of hypertermia over normothermia. In other words, the modulations of these genes are directly related to platinum resistance profiles and DNA repair caused by cisplatin [39]. The *HSPB1* gene that was upregulated in our experiment is transcribed into the HSP27 protein, which is involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Its dysregulation is associated with aggressiveness of the ovarian tumor, worse prognosis, and resistance to chemotherapy. Yasuda *et al.* (2017) showed the *HSPB1* gene is mainly expressed in malignant cells in response to stress and can be induced by constitutive activation in HSF1 in the phosphorylated

form [36].

The *HSPD1* gene is responsible for translating the HSP60 protein, regulated by another chaperone, called HSp10. Both at mitochondrial sites. It has been shown that HSp60 regulates the cell cycle and apoptosis through the mechanism mediated by the P53 gene [41]. The expression of HSP10 and consequently of HSP60 varies significantly between patients with EOC in patients treated with platinum and appears to confer a worse prognosis [41]. A study performed in head and neck cell cultures showed a positive correlation between mRNA levels and platinum resistance. An *in vitro* study conducted with A2780 ovarian carcinoma cells that were selected for resistance to cisplatin and oxaliplatin demonstrated an implication of overexpression of the *HSPD1* gene and its transcript with resistance to these drugs, and another study conducted by Zanfat *et al.*, demonstrated decreased overall survival in patients with ovarian EOC that express high levels of HSP60 [41].

The expression of the *TRAP1* gene is associated with the transcript TRAP1 (tumor necrosis factor receptor associated with protein 1) is a heat shock protein associated with anti-apoptotic and antioxidant functions, a component of the mitochondrial pathway of apoptosis. Over the last number of years, the literature associates high levels of this protein with ovarian cancer and platinum resistance. Nonetheless, there are conflicting data that low expressions may be related to a good EOC prognosis. TRAP1 is related to multiple drug resistance and response to chemotherapy with cisplatin [42], and associated with HSP27 and HSP70. Furthermore, it was found that *TRAP1* mRNA levels were significantly up-regulated in cisplatin-resistant EOC cell lineage [42].

Recent studies demonstrate that the mTOR pathway plays an essential role in stress regulation and response, as well as a role in HSF1 phosphorylation [40], and the mTOR pathway can be activated by heat. Therefore, a pathway can be studied in an attempt to inhibit HSP in HIPEC [47] We also analyzed different concentrations of everolimus, an inhibitor of the mTOR pathway, in an attempt to sensitize the cytotoxicity response in the hyperthermia group, considering that inhibition of the mTOR pathway could inhibit HSF1 thus modulating the expression of heat shock genes. In this experiment a sensitization was observed in the heated cisplatin group, improving the cytotoxicity results [36-37] [44].

Therefore, our study demonstrated that the group treated with heated cisplatin did not differ from the treated group unheated cisplatin with respect to cytotoxicity

results. Possibly, there was a positive modulated regarding the heat shock genes related to a worse survival. However, when we treated the cells with everolimus, a sensitization in the response was observed. Therefore, inhibition of the mTOR pathway seems to negatively modulate these genes related to a resistance and increased apoptosis [37-44].

One of the limitations of this study is an *in vitr*o study, but it is worth emphasizing the technical difficulty with clinical trials of HIPEC given the cost involved and the rules of reference centers capable of performing this procedure. However, considering these findings, clinical studies are necessary to confirm these data and try to improve the results of this technique, emphasizing that in a scenario of a disease sensitive to platinum and with BRCA mutation, we have other therapeutic options such as the use of a PARP inhibitor with superior results [45].

In conclusion, we observed that OV-90 serous ovarian cancer cell line, after treatment with heated cisplatin, had the heat shock genes *HSPA1A, TRAP1 and HSPB1* up-regulated. HSPB1 genes have the most expressive value expression. Our result showed that heat shock genes may be related to the chemotyping of resistance to therapy found in this tumor. However, the use of everolumus has the potential to sensitize cytotoxicity in a model using heated cisplatin and improved results. Therefore, it is necessary to evaluate these genes in a clinical study of HIPEC.

Competing interests

All authors declare no financial relationships with any organizations that might be interested in the submitted work; no other relationships or activities could appear to have influenced the submitted work.

Funding

This work was financially supported through grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5. References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: Cancer J Clin. 2021 May; 71(3): 209-249.

2. Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016; 66:7-30. 225.

3. Corrado G, Salutari V, Palluzzi E, Distefano MG, Scambia G, Ferrandina G. Optimizing treatment in recurrent epithelial ovarian cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2017 Dec;17(12):1147-1158. doi: 10.1080/14737140.2017.1398088.

4. du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, *et al*. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. J Natl Cancer Inst. 2003 Sep 3;95(17):1320-9. doi: 10.1093/jnci/djg036.

5. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX; Gynecologic Oncology Group. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. N Engl J Med. 2011 Dec 29;365(26):2473-83. doi: 10.1056/NEJMoa1104390.

6. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, *et al*. PAOLA-1 Investigators. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2019 Dec 19;381(25):2416-2428. doi: 10.1056/NEJMoa1911361.

7. Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, *et al*. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. J Clin Oncol. 1991 Mar;9(3):389-93. doi: 10.1200/JCO.1991.9.3.389.

8. Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, *et al*. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. J Clin Oncol. 1991 Mar;9(3):389-93. doi: 10.1200/JCO.1991.9.3.389.

9. Bakrin N, Bereder JM, Decullier E, Classe JM, Msika S, Lorimier G, *et al*. Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma: a French multicentre retrospective cohort study of 566 patients. Eur J Surg Oncol. 2013 Dec;39(12):1435-43. doi: 10.1016/j.ejso.2013.09.030.

10. van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR, *et al*. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2018 Jan 18;378(3):230-240. doi: 10.1056/NEJMoa1708618.

11. Koole SN, Kieffer JM, K Sikorska, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR, *et al*. Health-related quality of life after interval cytoreductive surgery with or without hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with stage III ovarian cancer. Eur J Surg Oncol. 2021 Jan;47(1):101-107. doi: 10.1016/j.ejso.2019.05.006.

12. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones. 2009 Jan;14(1):105-11. doi: 10.1007/s12192-008-0068-7.

13. Elstrand MB, Stavnes HT, Tropé CG, Davidson B. Heat shock protein 90 is a putative therapeutic target in patients with recurrent advanced-stage ovarian carcinoma with serous effusions. Hum Pathol. 2012 Apr;43(4):529-35. doi: 10.1016/j.humpath.2011.05.022.

14. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. Trends Pharmacol Sci. 2017 Mar;38(3):226-256. doi: 10.1016/j.tips.2016.11.009.

15. Dai C, Sampson SB. HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. Trends Cell Biol. 2016 Jan;26(1):17-28. doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.011. Epub 2015 Nov 18.

16. Zhao M, Ding JX, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin YX, *et al*. Heat shock protein 27: a potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer? Tumour Biol. 2014 Feb;35(2):1051-6. doi: 10.1007/s13277-013-1139-7.

17. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

19. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, *et al*. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. doi: 10.1093/nar/gku1003

20. Myles H, Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons, 1999.

21. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J. Amer. Statist. Assn. 1958; 53 (282): 457–481.

23. Sun C, Li N, Ding D, Weng D, Meng L, Chen G, Ma D. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. PLoS One. 2014 May 1;9(5):e95285.

24. Chan JK, Tian C, Monk BJ, Herzog T, Kapp DS, Bell J, Young RC; Gynecologic Oncology Group. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer. 2008 May 15;112(10):2202-10. doi: 10.1002/cncr.23390.

25. Lotti M, Capponi MG, Piazzalunga D, Poiasina E, Pisano M, Manfredi R, *et al*. Laparoscopic HIPEC: A bridge between open and closed-techniques. J Minim Access Surg. 2016 Jan-Mar;12(1):86-9. doi: 10.4103/0972-9941.158965.

26. Hotouras A, Desai D, Bhan C, *et al*. Heated Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for Patients with Recurrent Ovarian Cancer: A Systematic Literature Review. International Journal of Gynecologic Cancer 2016;26:661-670.

27. Batista TP. Comment on: Surgery and HIPEC in Recurrent Epithelial Ovarian Cancer: A Prospective Randomized Phase III Study. Ann Surg Oncol. 2017 Dec;24(Suppl 3):630. doi: 10.1245/s10434-017-6151-5.

28. Mabuchi S, Sugiyama T, Kimura T. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. J Gynecol Oncol. 2016 May;27(3):e31. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e31.

29. Tang H, Liu Y, Wang X, Guan L, Chen W, Jiang H, *et al*. Clear cell carcinoma of the ovary: Clinicopathologic features and outcomes in a Chinese cohort. Medicine (Baltimore). 2018 May;97(21):e10881. doi: 10.1097/MD.0000000000010881.

30. Chien J, Kuang R, Landen C, Shridhar V. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. Front Oncol. 2013 Sep 24;3:251. doi: 10.3389/fonc.2013.00251.

31. Harder B, Tian W, La Clair JJ, Tan AC, Ooi A, Chapman E, Zhang DD. Brusatol overcomes chemoresistance through inhibition of protein translation. Mol Carcinog. 2017 May;56(5):1493-1500. doi: 10.1002/mc.22609.

32. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, *et al*. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. N Engl J Med. 2006 Jan 5;354(1):34-43. doi: 10.1056/NEJMoa052985.

33. Walker JL, Brady MF, Wenzel L, Fleming GF, Huang HQ, DiSilvestro PA, *et al*. Randomized Trial of Intravenous *Versus* Intraperitoneal Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Ovarian Carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol. 2019 Jun 1;37(16):1380-1390. doi: 10.1200/JCO.18.01568.

34. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. Cell Death Differ. 2004 Apr;11(4):390-402. doi: 10.1038/sj.cdd.4401369.

35. Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, Chi KN. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. Nat Rev Urol. 2015 Jan;12(1):26-36. doi: 10.1038/nrurol.2014.320.

36. Yasuda K, Hirohashi Y, Mariya T, Murai A, Tabuchi Y, Kuroda T, *et al*. Phosphorylation of HSF1 at serine 326 residue is related to the maintenance of gynecologic cancer stem cells through expression of HSP27. Oncotarget. 2017 May 9;8(19):31540-31553. doi: 10.18632/oncotarget.16361.

37. Zaytseva YY, Valentino JD, Pat Gulhati P, Evers M. mTOR inhibitors in cancer therapy. Cancer Letters. 2012; 319(1):1-7.

38. Elstrand MB, Kleinberg L, Kohn EC, Tropé CG, Davidson B. Expression and clinical role of antiapoptotic proteins of the bag, heat shock, and Bcl-2 families in effusions, primary tumors, and solid metastases in ovarian carcinoma. Int J Gynecol Pathol. 2009 May;28(3):211-21.

39. Andrade WP, Gonçalves BOP, Silva LM, Dasilva Filho AL. Upregulation of HSPB1 heat shock gene and ERCC1 gene on serous ovarian cancer cell line in HIPEC in vitro model. Journal of Clinical Oncology 2021 39:15_suppl, e17559-e17559. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e17559

40. Cheng J, Lv Z, Weng X, Ye S, Shen K, Li M, Qin Y, Hu C, Zhang C, Wu J, Zheng S. Hsp27 Acts as a Master Molecular Chaperone and Plays an Essential Role in Hepatocellular Carcinoma Progression. Digestion. 2015;92(4):192-202. doi: 10.1159/000431254.

41. Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. J Clin Oncol. 1993 May;11(5):891-8. doi: 10.1200/JCO.1993.11.5.891.

42. Amoroso MR, Matassa DS, Agliarulo I, Avolio R, Lu H, Sisinni L, Lettini G, *et al*. TRAP1 downregulation in human ovarian cancer enhances invasion and epithelial-mesenchymal transition. Cell Death Dis. 2016 Dec 15;7(12):e2522. doi: 10.1038/cddis.2016.400.

43. Saini J, Sharma PK. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. Curr Drug Targets. 2018;19(13):1478-1490. doi: 10.2174/1389450118666170823121248.

44. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. Cell Cycle. 2006 Nov;5(22):2592-601. doi: 10.4161/cc.5.22.3448.

45. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. [Internet]. Toronto; 2021. Access 28 Jun 2021. Avaliable in: http://genemania.org/.

46. Pujade-Laurainea JAL, R.T. Pensonc, A.M. Ozad, J. Korache, T. Huzarskif, A. Povedag, *et al*. Treatment with olaparib monotherapy in the maintenance setting significantly improves progression-free survival in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer: Results from the phase III SOLO2 study. SGO Annual Meeting on Women's Cancer; 2017; National Harbor, MDOlaparibe estudo solo.

47. Chou SD, Prince T, Gong J, Calderwood SK. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. PLoS One. 2012;7(6):e39679. doi: 10.1371/journal.pone.0039679.

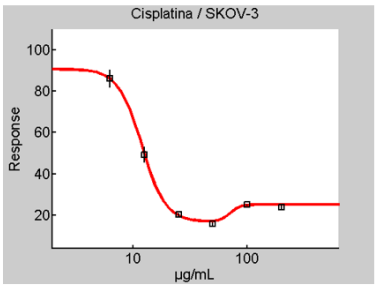
8. Considerações Finais

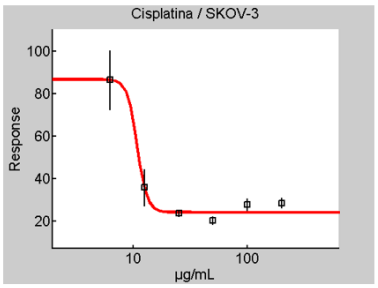
Este estudo é uma pesquisa promissora e original que buscou responder questões relacionadas a um tratamento inovador e desafiador. Foi utilizada uma abordagem translacional para explicar os mecanismos moleculares envolvidos entre a hipertermia e os genes do choque térmico para o tratamento do câncer. Além do objetivo de melhorar os resultados da HIPEC, este estudo gerou maiores conhecimentos para que outras investigações clínicas possam ser realizadas no futuro para corroborar nossos achados. Todas as análises realizadas foram desenvolvidas na tentativa de aprimorar o tratamento do câncer e a qualidade de vida de nossas pacientes.

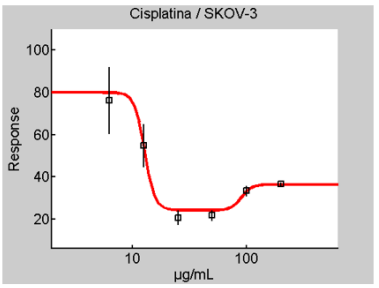
9. Anexos

8. ANEXOS

ANEXO A - Determinação da curva de IC_{50} dos ensaios



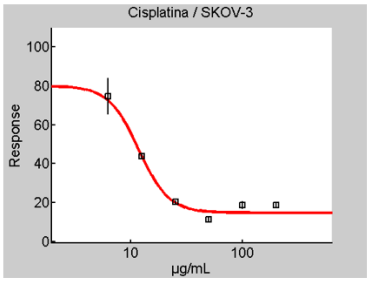


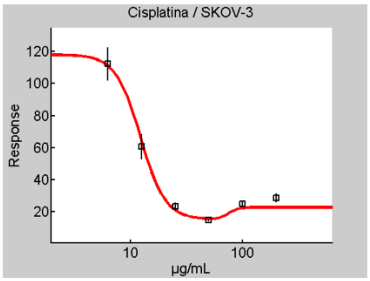


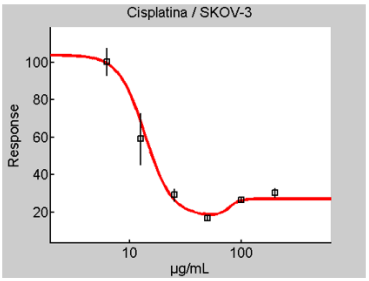
12,5 µg/mL 11,2 µg/mL 12,9 µg/mL

Média = 12,2 µg/mL

Valor de IC_{50} determinado para a SKOV-3 tratada com cisplatina não aquecida.



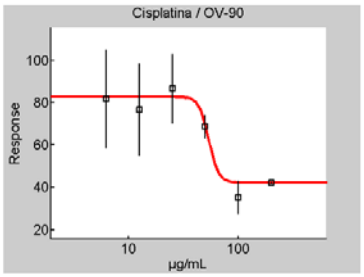




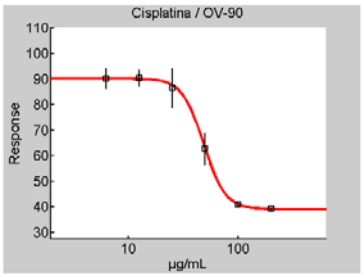
11,2 µg/mL 14,5 µg/mL 15,8µg/mL

Média= 13,83µg/mL

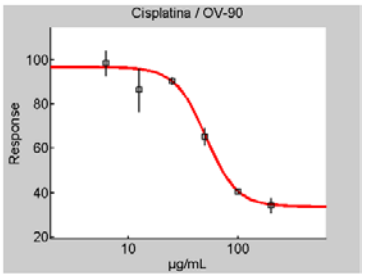
Valor de IC_{50} determinado para a SKOV-3 tratada com cisplatina aquecida a 41Cº.



61,6 µg/mL



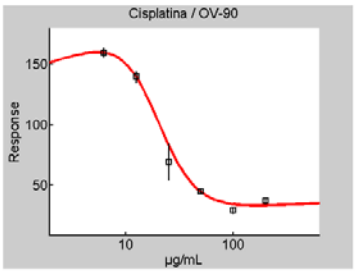
64,3 µg/mL



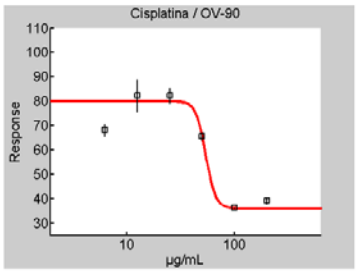
71,2 µg/mL

Média = 65,7 µg/mL

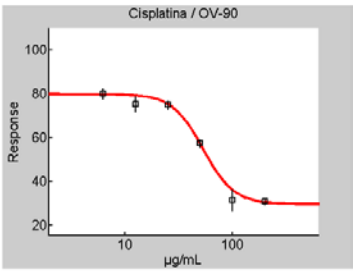
Valor de IC_{50} determinado para a OV-90 tratada com cisplatina não aquecida.



42,1 µg/mL



58,1 µg/mL

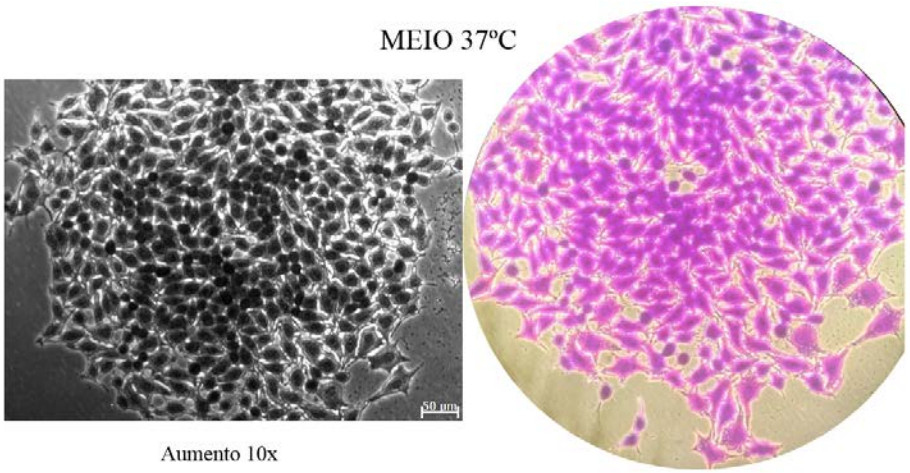


60,2 µg/mL

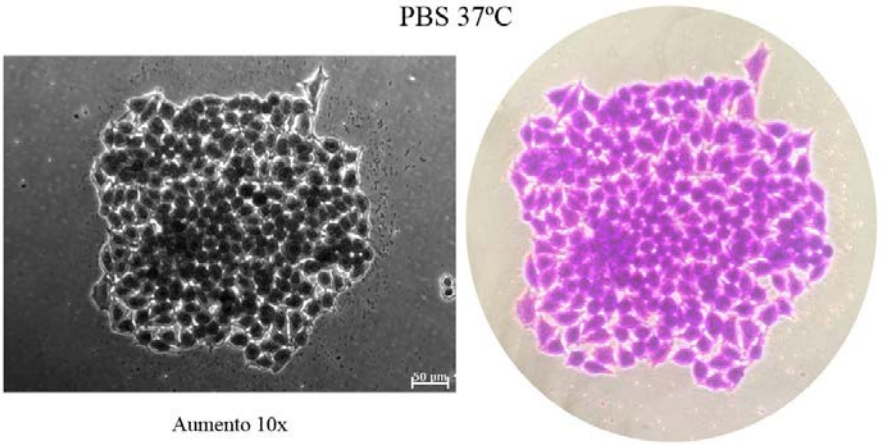
Média= 53,46 µg/mL

Valor de IC_{50} determinado para a OV-90 tratada com cisplatina aquecida a 41ºC.

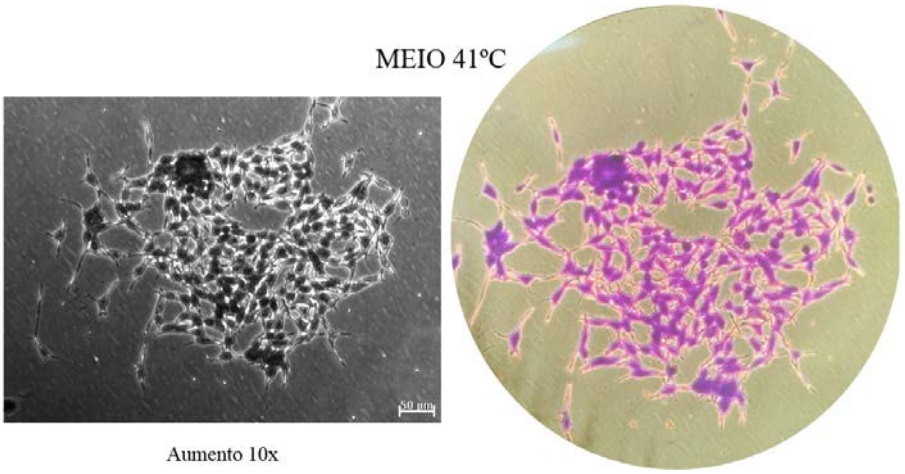
ANEXO B - Registro das imagens dos ensaios clonogênicos



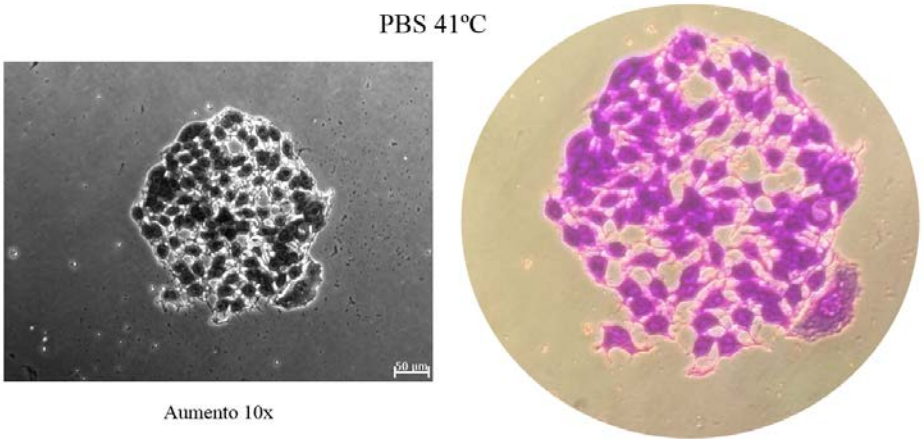
Ensaio clonogênico TOV-21G em meio não aquecido.



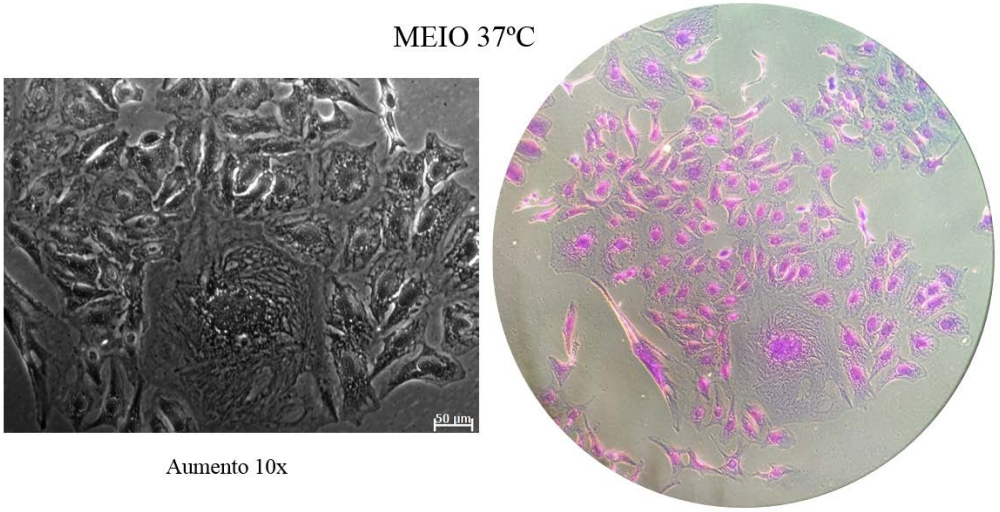
Ensaio clonogênico TOV-21G em PBS não aquecida.



Ensaio clonogênico TOV-21G em meio aquecido a 41ºC.

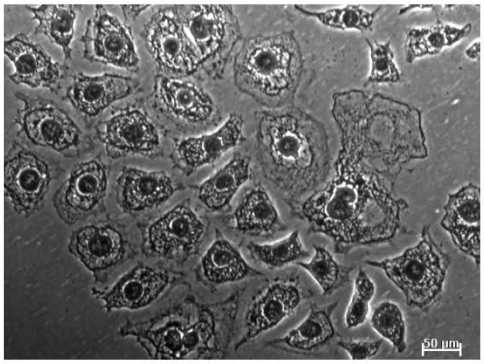


Ensaio clonogênico TOV-21G em PBS aquecido a 41ºC.

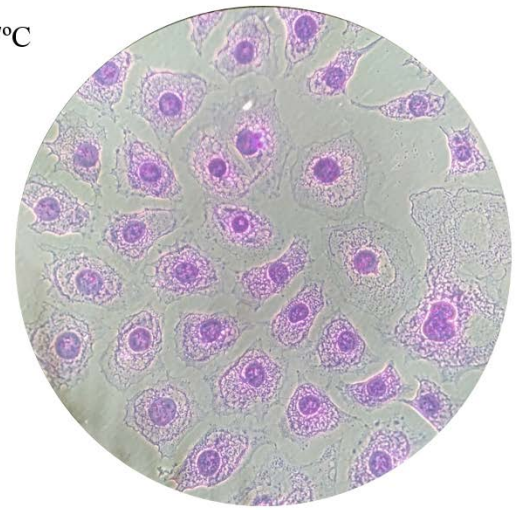


Ensaio clonogênico SKOV-3 em meio não aquecido.

PBS 37ºC

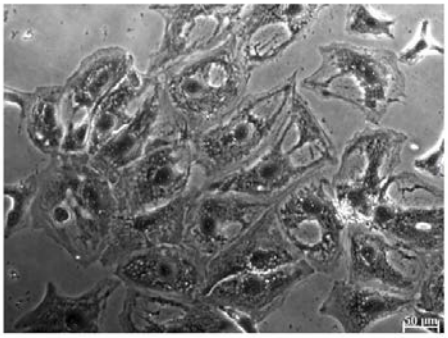


Aumento 10x

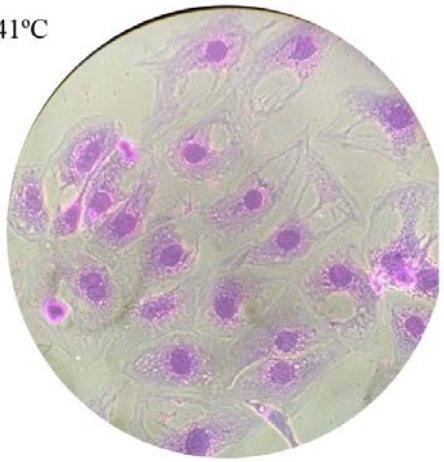


Ensaio clonogênico SKOV-3 em PBS não aquecido.

MEIO 41ºC

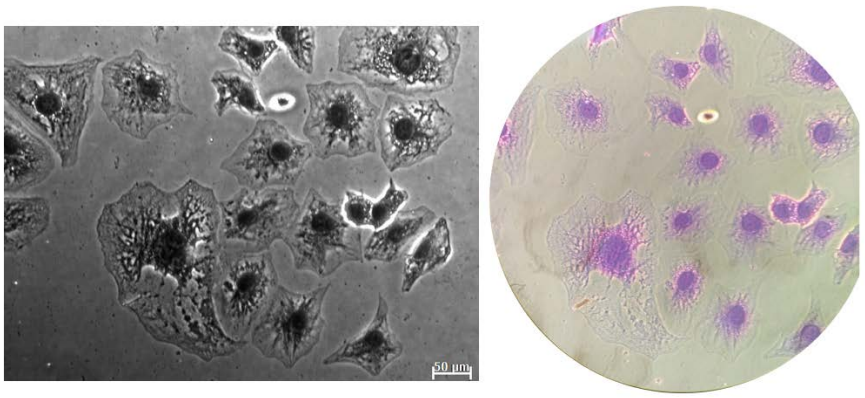


Aumento 10x



Ensaio clonogênico SKOV-3 em meio aquecido a 41ºC.

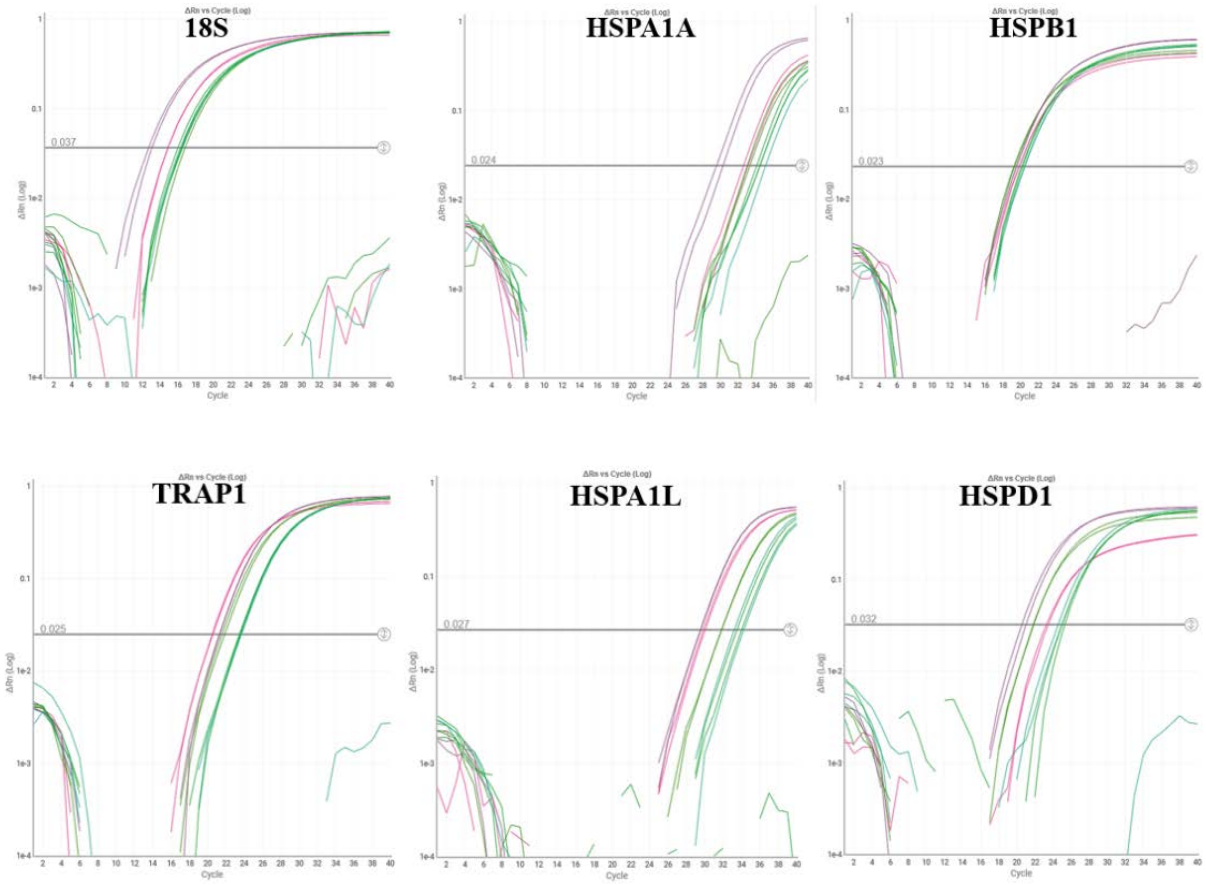
PBS 41ºC



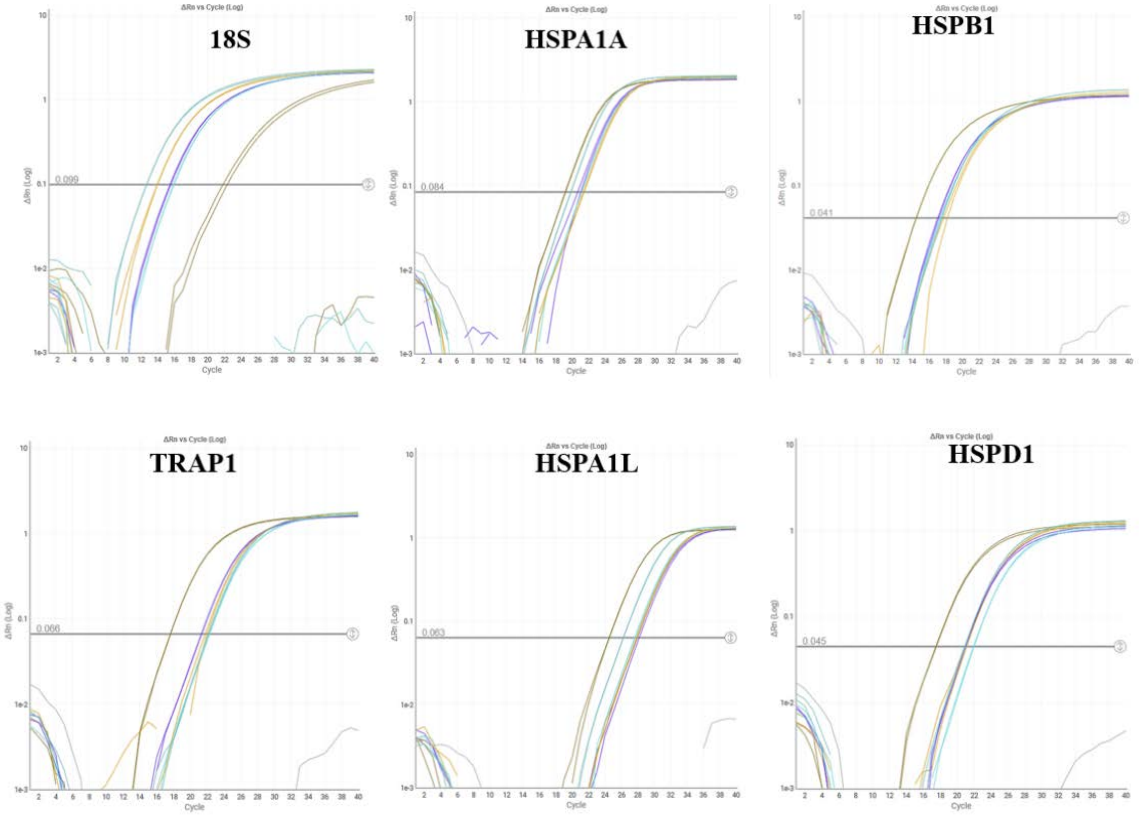
Aumento 10x

Ensaio clonogênico SKOV-3 em PBS aquecido a 41ºC.

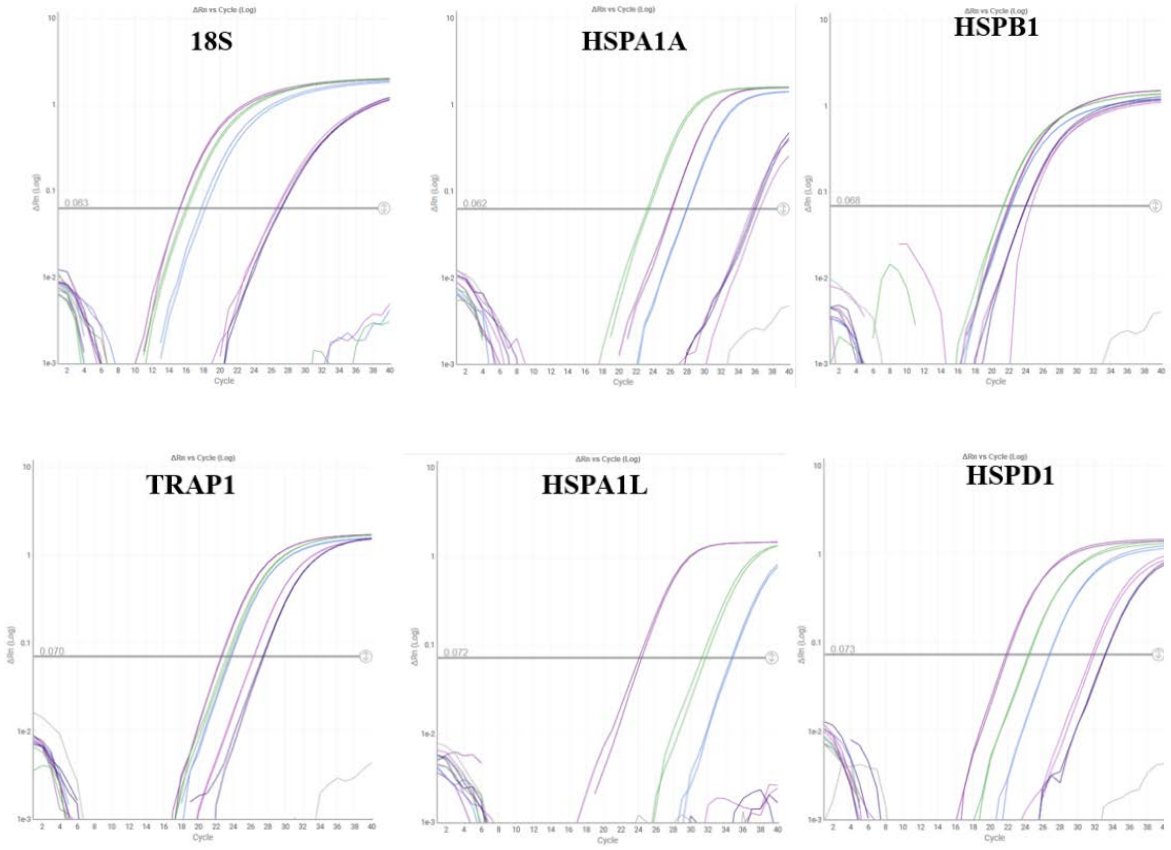
ANEXO C – Curva de amplificação e dissociação



Análise da expressão dos transcritos nas amostras de TOV-21G avaliando os genes *18S* (controle endógeno), *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* e *HSPD1*.



Análise da expressão dos transcritos nas amostras de SKOV-3 avaliando os genes *18S* (controle endógeno), *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* e *HSPD1.*



Análise da expressão dos transcritos nas amostras de OV-90 avaliando os genes *18S* (controle endógeno), *HSPA1A, HSPB1, TRAP1, HSPA1L* e *HSPD1*.