

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/09/2023.



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!!!!



Agradecimientos

Agradeço à Prof^a. Dra. **Luciana Maria Silva Lopes** e toda equipe da FUNED, pelo apoio logístico e pelo tempo dedicado à sua orientação. Obrigado por ter acreditado no meu projeto, apoiar as minhas ideias. Você realmente é 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 (37°C) e cisplatina em hipertermia (41°C) e um grupo controle tratado com solução salina PBS de 37 a 41°C) 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 everolimus

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 <i>Influxo/efluxo de cisplatina</i>	31
1.5.1.2 <i>Detoxificação</i>	32
1.5.1.3 <i>Reparo a danos no DNA</i>	32
1.5.1.4 <i>Sinalização da apoptose</i>	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 <i>in silico</i> 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 a 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

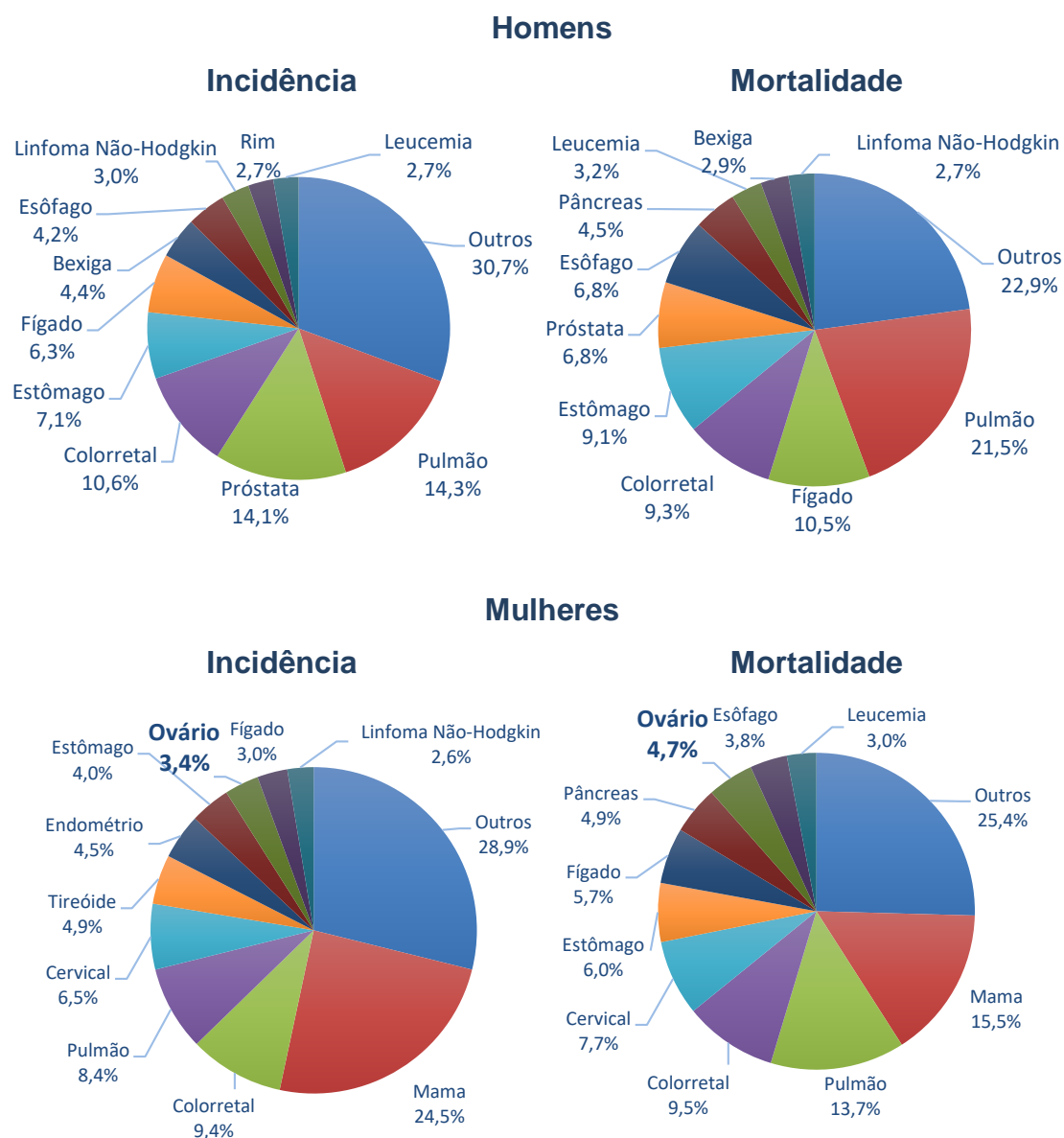
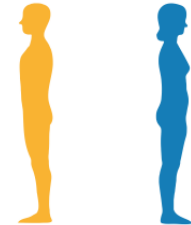


FIGURA 1. Distribuição de casos e mortes por área mundial, em 2020, para homens e mulheres.
 Fonte: Adaptado GLOBOCAN, 2020

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	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			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 estadió 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



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 RI. 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. Available 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. Available 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, Côté 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 leM. The origin and pathogenesis of Epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar; 34(3):433-43.
15. Shih leM, *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, MD* Olaparibe 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, Elsevier. 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*. *Experientia*, 1962; 13:571-573.
55. Schmitt E, Gehrman 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, Zoubeydi 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 apoptotic 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, Scheffe 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