

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Biologia Geral**

**Programa de Pós-graduação em Genética**

**Nikole Gontijo Gonçalves**

**Análise de diferentes programas de morte e sobrevivência celular,  
relacionadas ao mecanismo de quimiorresistência na linhagem  
celular de câncer de ovário SKOV-3**

**BELO HORIZONTE**

**2020**

**Nikole Gontijo Gonçales**

**ANÁLISE DE DIFERENTES PROGRAMAS DE MORTE E SOBREVIVÊNCIA  
CELULAR RELACIONADO AO MECANISMO DE QUIMIORRESISTÊNCIA NA  
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE OVÁRIO SKOV-3**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Genética.

**Orientadora:** Dra. Luciana Maria Silva Lopes

**BELO HORIZONTE**

**2020**

043

Gonçales, Nikole Gontijo.

Análise de diferentes programas de morte e sobrevivência celular relacionado ao mecanismo de quimiorresistência na linhagem celular de câncer de ovário SKOV-3 [manuscrito] / Nikole Gontijo Gonçales. – 2020.

67 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Luciana Maria Silva Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Neoplasias Ovarianas. 3. Antineoplásicos. 4. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. I. Lopes, Luciana Maria Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (projeto 420426/2016-7) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**Nikole Gontijo Gonçalves**

299/2020  
entrada  
1º/2018  
CPF:  
004.915.740-02

Às nove horas do dia **05 de junho de 2020**, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Análise de diferentes programas de morte e sobrevivência celular, relacionadas ao mecanismo de quimiorresistência na linhagem celular de câncer de ovário SKOV-3**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Luciana Maria Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Luciana Maria Silva	Fundação Ezequiel Dias		
Frederico Marianetti Soriani	UFMG		aprovada
Aline Brito de Lima	Hermes Pardini		APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: \_\_\_\_\_  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 05 de junho de 2020.**

Dra. Luciana Maria Silva - Orientadora \_\_\_\_\_ 

Dr. Frederico Marianetti Soriani \_\_\_\_\_ 

Dra. Aline Brito de Lima \_\_\_\_\_ 



Pós-Graduação em Genética  
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, ICB  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3499-2570



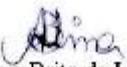
**"Análise de diferentes programas de morte e sobrevivência celular,  
relacionadas ao mecanismo de quimiorresistência na linhagem celular  
de câncer de ovário SKOV-3."**

**Nikole Gontijo Gonçalves**

Disertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Luciana Maria Silva - Orientador  
Fundação Ezequiel Dias

  
Frederico Marianetti Soriani  
UFMG

  
Aline Brito de Lima  
Hermes Pardini

Belo Horizonte, 05 de junho de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a Deus por me dar sabedoria, discernimento e força em todos os meus caminhos.

Aos meus pais, Carlos e Sônia, pelo amor incondicional.

Dedico este trabalho ao meu pai, que infelizmente não está aqui hoje, mas que enquanto esteve comigo foi meu melhor amigo, meu maior incentivador, e mesmo na sua ausência, a sua lembrança me faz querer entregar o melhor de mim e me sentir grata por ter tido um pai que nunca deixou de mostrar seu amor incondicional e nunca poupou esforços para que eu realizasse meus sonhos.

Agradeço a minha mãe por ser meu maior exemplo de força e ser presente nos momentos que mais precisei. Obrigada por me admirar e incentivar com tanto amor e orgulho, até nas horas que eu mesma não acreditava mais.

À minha irmã Lidia e minhas sobrinhas Naira e Âmina, pelas reuniões em família que sempre renovam minhas energias e me trazem o aconchego do amor em família.

Agradeço aos colegas do Serviço de Biologia Celular pela convivência e disponibilidade em sempre ajudar. Em especial à Milene, que foi um grande suporte e esteve disposta a me ajudar sempre que precisei, dividindo comigo seu conhecimento e me auxiliando durante todo o mestrado. À Heloísa e Christiane pela disponibilidade e ajuda com os percalços do dia a dia. À Rita, pelas conversas e risadas e seu cuidado com o laboratório, essencial para a realização dos experimentos.

Aos amigos Amanda, Pâmela e Janderson, por estarem comigo há tanto tempo e sempre se fazerem presente mesmo com a distância. É reconfortante saber que posso sempre contar com vocês.

À Erick e Hortênsia, dois amigos que a pós me presenteou e me fez admirar profissionalmente e pessoalmente, que sorte a minha ter vocês para um trabalho em grupo, um café, um desabafo, um reagente doado e até mesmo um cinema.

À Paula, pelas conversas sobre as infinitas possibilidades que o futuro nos dá, e por compartilhar comigo a vontade de abraçar todas elas.

À Aline, que de colega de trabalho, hoje posso chamar de amiga, a quem eu tenho uma grande admiração e respeito. Obrigada pelos ensinamentos acompanhados de lanches.

À Hizana e Felipe, minhas companhias diárias do mestrado. Posso afirmar que minha caminhada se tornou mais leve e feliz por ter vocês comigo. Vocês são a prova de que as amizades nos dão força e coragem para seguir em frente. Contem sempre comigo.

À professora Maria Raquel, por ter me recebido em seu laboratório no início do mestrado.

À minha orientadora Luciana, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto. Por confiar em mim e me dar autonomia para crescer profissionalmente. Agradeço pelas conversas, ensinamentos, oportunidades e dedicação na reta final. Obrigada por ser uma referência profissional da mulher brasileira na pesquisa.

Agradeço aos coordenadores, professores e à secretária do programa de Pós-graduação em Genética.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.” (Clarice Lispector).

## RESUMO

O câncer de ovário apresenta a maior taxa de mortalidade entre os tumores ginecológicos. O tratamento quimioterápico a base de platina e taxanos é a primeira linha de tratamento oferecido às pacientes, mas apesar da resposta inicial, 60-80% apresentarão recidiva da doença associada à quimiorresistência. O ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e seus receptores (TRAIL-R) têm sido alvo de estudos desde a descoberta de que esta proteína induz a morte em células tumorais, mas não em células normais. Elucidar o mecanismo pelo qual TRAIL atua nos diferentes tipos tumorais pode direcionar o seu uso corretamente na prática clínica. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a participação de alvos relacionados ao sistema TRAIL/TRAIL-R na quimiorresistência na linhagem celular de tumor de ovário SKOV-3. A caracterização celular da linhagem SKOV-3 para os receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3 foi realizada através de citometria de fluxo e imunofluorescência. Os resultados mostraram que estes receptores não se encontram dispostos na membrana celular ou no interior das células. Já no nível de transcritos, foi possível detectar a presença de mRNA para ambos os alvos, podendo-se inferir que uma regulação pós-transcricional destes receptores está ocorrendo nessa linhagem celular. Nos ensaios de viabilidade celular realizados pelo método MTT foram determinadas as concentrações de 0,015mg/mL de cisplatina, 100ng/mL de rhTRAIL e 0,025mg/mL;100ng/mL de cisplatina e rhTRAIL em combinação para tratar as células e realizar a extração de RNA. A avaliação do perfil de expressão dos genes *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, *TRAIL-R3*, *TRAIL-R4*, *RIPK1*, *MLKL*, *NFKB1*, *RELA*, *TP53*, *CASP8* e *CFLAR* foi avaliada por RT-qPCR. Nos três tratamentos foi observado um perfil de expressão diferencial. No tratamento com cisplatina foi observado um aumento na expressão de *TP53*. No tratamento com rhTRAIL, houve aumento de *NFKB1* e *RELA*, indicativos de que a via de NF-kB pode ter sido iniciada. Já no tratamento com a combinação das drogas cisplatina e rhTRAIL o maior aumento na expressão foram dos alvos *RIPK1* e *MLKL*, indicando que o mecanismo de necroptose pode ter sido desencadeado frente ao tratamento. Estes resultados mostram como o tratamento quimioterápico nem sempre culmina somente em apoptose, mas também regula transcricionalmente vias de sobrevivência e morte inflamatória.

Palavras-chave: câncer de ovário, Cisplatina, TRAIL, quimiorresistência

## ABSTRACT

Ovarian cancer presents the highest rate of mortality among gynecological tumors. Chemotherapy based on platin and taxane compounds is the first line of treatment available for patients, therefore the initial response, about 60-80% will present relapse of the disease-associated to chemoresistance. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors (TRAIL-R) have become a target for cancer therapy since the discovery that this protein can induce death in tumoral cells and spare normal cell. Draw the mechanisms by which TRAIL acts in different tumoral types can orientate its right use in clinical practice. Thus, this work aims to evaluate the participation of targets related to the TRAIL/TRAIL-R system and chemoresistance in the ovarian cancer cell line SKOV-3. Characterization of the SKOV-3 cell line regarding TRAIL-R2 and TRAIL-R3 receptors was accomplished by flow cytometry and immunofluorescence. The results showed that these receptors were not present in the surface of the cell membrane, cytoplasm, or nucleus. At the transcriptional level, both mRNAs of TRAIL-R2 and TRAIL-R3 were detected, and by that, it can be assumed that post-transcriptional regulation of these receptors is happening in this cell line. Viability assays were performed by MTT and the concentrations found to cisplatin were 0.015mg/mL, 100ng/mL for rhTRAIL, and 0.025mg/mL;100ng/mL for cisplatin and rhTRAIL combinations to treat cells and perform the RNA extraction. Evaluation of gene expression profile of *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, *TRAIL-R3*, *TRAIL-R4*, *RIPK1*, *MLKL*, *NFKB1*, *RELA*, *TP53*, *CASP8* and *CFLAR* was performed by RT-qPCR. Three differential responses in the profile of gene expression were observed. Cisplatin's treatment up-regulated the expression of *TP53*. rhTRAIL's treatment up-regulated *NFKB1* and *RELA* gene expression, suggesting that the NF-kB pathway may have initiated. Already in the combination of both drugs, *RIPK1* and *MLKL* were up-regulated, indicating that death by necroptosis may have activated. These results demonstrate that chemotherapy treatment not always reaches apoptosis but also transcriptionally regulates survival pathways and inflammatory death.

Keywords: ovarian cancer, Cisplatin, TRAIL, chemoresistance

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vias de sinalizações ativadas por TRAIL. ....	22
Figura 2: Mecanismo de silenciamento por siRNA.....	34
Figura 3: Curva de sobrevida da linhagem SKOV-3 tratada com cisplatina .....	35
Figura 4: Relação da resistência e sensibilidade à cisplatina em linhagens celulares.....	36
Figura 5: Curvas de sobrevida da linhagem SKOV-3 após tratamento com rhTRAIL.....	37
Figura 6: Curva de sobrevida da linhagem SKOV-3 após tratamento com a combinação de cisplatina e rhTRAIL.....	38
Figura 7: Curva de sobrevida da linhagem SKOV-3 tratada com a concentração fixa de cisplatina e concentrações variáveis de rhTRAIL.....	39
Figura 8: Análise dos receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3 na linhagem SKOV-3 por citometria de fluxo.....	40
Figura 9: Amplificação de produtos por RT-PCR com iniciadores específicos .....	41
Figura 10: Imunofluorescência das células SKOV-3 impermeabilizadas .....	42
Figura 11: Imunofluorescência das células SKOV-3 permeabilizadas.....	44
Figura 12: Integridade do RNA extraído das células SKOV-3 controle e tratadas .....	45
Figura 13: Perfil de expressão gênica da linhagem SKOV-3 após tratamentos.....	47
Figura 14: Porcentagem de silenciamento de TRAIL-R2 obtido na linhagem SKOV-3.....	52
Figura 15: Alinhamento da sequência do miRNA com o mRNA de TRAIL-R2 .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações e volumes a serem utilizados na reação de síntese de cDNA .....	29
Tabela 2: Condições de ciclagem para RT-qPCR.....	30
Tabela 3: Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.....	31
Tabela 4: Relação dos siRNAs utilizados no ensaio de silenciamento.....	33
Tabela 5: Quantificação e pureza do RNA total extraído das células SKOV-3 tratadas e controle.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALAS1 - *5'-Aminolevulinate Synthase 1*

ATCC - do inglês “*American Type Culture Collection*”

cDNA - DNA complementar

CEO - Câncer Epitelial de Ovário

CFLAR - *CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator*

CO - Câncer de ovário

Ct - ciclo de *Threshold*

DISC - Complexo Sinalizador Indutor de Apoptose

DNA - ácido desoxirribonucleico

FADD - *Fas Associated Via Death Domain*

FW - iniciador *Forward*

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MLKL - *Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*

NF-kB - fator nuclear kappa B

NFKB1 - *Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*

NK - células natural *killer*

p53 - proteína tumoral p53

PBS - solução salina de fosfato

qRT-PCR - reação da cadeia em polimerase (PCR) quantitativa em tempo real

RELA - *RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit*

rhTRAIL - TRAIL humano recombinante

RIPK1 - *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1*

RIPK3 - *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3*

RNA - ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPL13A - *Ribosomal Protein L13a*

RV - iniciador *Reverse*

SFB - soro fetal bovino

TBP - *TATA-Box Binding Protein*

TNF - fator de necrose tumoral

TNFRSF10A - *TNF Receptor Superfamily Member 10a*

TNFRSF10B - *TNF Receptor Superfamily Member 10b*

TNFRSF10C - *TNF Receptor Superfamily Member 10c*

TNFRSF10D - *TNF Receptor Superfamily Member 10d*

TNFSF10 - *TNF Superfamily Member 10*

TP53 - *Tumor Protein P53*

WHO - *World Health Organization*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. METODOLOGIA.....	26
3.1 CULTIVO CELULAR.....	26
3.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	26
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	27
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	28
3.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA.....	28
3.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE.....	28
3.7 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR.....	28
3.8 OTIMIZAÇÃO DOS INICIADORES.....	29
3.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	29
3.10 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	32
3.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	32
3.12 SILECIAMENTO ALVO TRAIL-R2.....	32
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	34
4.2 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO, RT-PCR E IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	40
4.3 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA.....	44
4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	45
4.4 SILENCIAMENTO CELULAR DE TRAIL-R2.....	51
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	55
7. ANEXOS.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um grupo de doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células anormais devido ao desequilíbrio entre proliferação e morte celular, adquirindo a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos (LETAI, 2017; INCA, 2019).

A incidência e mortalidade por câncer vêm crescendo rapidamente no mundo todo, diversas são as razões, mas esse aumento reflete principalmente o envelhecimento e crescimento populacional, bem como as mudanças na prevalência e fatores de risco, os quais estão associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY *et al.*, 2018). No ano de 2018, houve 18.1 milhões de novos casos de câncer em todo mundo e 9.6 milhões de morte, tornando esta doença a segunda maior causa de morte no mundo (GLOBOCAN, 2018).

Mundialmente, 295 mil novos casos de câncer de ovário (CO) foram diagnosticados no ano de 2018, e 189 mil mortes foram registradas. Apesar da baixa incidência quando comparado ao câncer de mama (2.1 milhões), esta doença apresenta pior prognóstico e maior taxa de mortalidade (MOMENIMOVAHED *et al.*, 2019). No Brasil, o número de novos casos para o ano de 2020 é de 6.650 (INCA, 2020).

A letalidade desse tumor se deve principalmente ao fato de que mais de 75% das mulheres afetadas são diagnosticadas em estágios avançados, pois a doença em estágio inicial é assintomática, e em estágio tardio apresenta sintomas inespecíficos (DOUBENI; DOUBENI; MYERS, 2016).

O estadiamento da doença é feito de acordo com as recomendações da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) e leva em consideração três fatores: a extensão (tamanho) do tumor, a propagação para os linfonodos e propagação (metástase) para fluidos ou outros órgãos (JAVADI *et al.*, 2016; PRAT *et al.*, 2015).

O CO pode se originar de três tipos celulares diferentes: células epiteliais, germinativas e do estroma, sendo que o câncer epitelial de ovário (EOC) corresponde a 95% dos casos. Histologicamente, o EOC é classificado em cinco subtipos: seroso de alto grau, seroso de baixo grau, células claras, endometrióide e mucinoso. Todos esses subtipos exibem diferentes padrões de apresentação, resposta clínica e terapêutica, baseados na biologia tumoral intrínseca (DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN; GENESTIE, 2015; LHEUREUX; BRAUNSTEIN; OZA, 2019).

Apenas 11-15% dos tumores de ovário são de origem hereditária. Quando se leva em consideração a contribuição genética na carcinogênese, uma distinção importante é se uma mutação é germinativa ou somática. As mutações germinativas são herdadas e se encontram presentes em todas as células, já as mutações somáticas são adquiridas durante a tumorigênese e se encontram apenas nas células tumorais (FREY; POTHURI, 2017). Os genes *BRCA1* (*BRCA1 DNA Repair Associated*) e *BRCA2* (*BRCA2 DNA Repair Associated*) são os mais conhecidos e descritos ligados à susceptibilidade do CO. Estes genes codificam proteínas envolvidas no sistema de reparo por recombinação homóloga em quebras de fita dupla do DNA (PALMIROTTA *et al.*, 2017).

Estudos têm demonstrado que o CO é uma doença extremamente heterogênea composta por um grupo diversificado de tumores que podem ser classificados com base nas suas características morfológicas, genéticas e moleculares. Esta heterogeneidade reflete no comportamento clínico-patológico dos tumores (ROJAS *et al.*, 2016).

Com base nessas características, KURMAN e SHIH (2010) propuseram pela primeira vez a classificação dos tumores epiteliais de ovário em dois grupos: o grupo dos tumores Tipo I são compostos por tumores de células claras, mucinosos, endometrióides de baixo grau, serosos de baixo grau e transicionais (Brenner). São clinicamente indolentes, de crescimento lento, se encontram confinados aos ovários no diagnóstico, são relativamente estáveis geneticamente e sem mutações em *TP53*. Já o grupo dos tumores do Tipo II (carcinoma seroso de alto grau e carcinomas indiferenciados) são altamente agressivos de desenvolvimento rápido, sendo a maioria diagnosticado em estágios avançados, conferindo um pior prognóstico. Apresentam mutações em *TP53* em mais de 80% dos casos (KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2017). Os tumores do Tipo I representam 25% da incidência do CEO e são responsáveis por 10% das mortes, já os tumores do Tipo II representam 75% da incidência e 90% das mortes (KURMAN; SHIH, 2011)

O tratamento disponível para as pacientes é a realização da cirurgia para ressecção tumoral completa e quimioterapia (adjuvante ou neoadjuvante) padrão com os compostos a base de platina (cisplatina ou carboplatina) e taxano (paclitaxel) (Ministério da Saúde, 2019).

Molecularmente, 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. A ligação da platina ao DNA distorce sua estrutura e interfere nos processos de replicação e transcrição, levando a célula à morte. Além disso, a cisplatina também interage com a mitocôndria levando ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), destrói os lisossomos levando a liberação das

proteases lisossomais e degrada o retículo endoplasmático, o qual resulta na desregulação do estoque de cálcio e dobramento de proteínas (MAKOVEC, 2019; SHALOAM; TCHOUNWOU, 2014). Apesar de sua efetividade, este quimioterápico apresenta vários efeitos colaterais nas pacientes e mecanismos de resistência são desenvolvidos pelas células (MARTINHO *et al.*, 2019).

Já o composto taxano apresenta um mecanismo de ação que difere da maioria dos agentes citotóxicos, pois não interage diretamente com componentes nucleares (DNA e RNA), atuando assim nos microtúbulos durante a fase mitótica do ciclo celular (WEAVER, 2014). Em eucariotos, os microtúbulos estão envolvidos em uma diversificada gama de funções celulares, incluindo a mitose e meiose, motilidade, manutenção da forma da célula e tráfego intracelular de macromoléculas e organelas (BROUHARD; RICE, 2018).

Apesar da resposta inicial ao tratamento quimioterápico, aproximadamente 60-80% das pacientes eventualmente apresentarão recidiva associada à quimiorresistência (GIORNELLI, 2016; LUVERO *et al.*, 2019; STORDAL *et al.*, 2012). No geral, a sobrevida das pacientes diagnosticadas em estágios avançados de CO se mantém baixa, particularmente se o tumor for platino/taxano resistente (VAN ZYL; TANG; BOWDEN, 2018).

Um tumor platino resistente é definido pela progressão tumoral durante o tratamento inicial com quimioterápicos compostos a base de platina ou reincidência da doença no prazo de seis meses (DAVIS; TINKER; FRIEDLANDER, 2014). Tumores e metástases podem adquirir resistência ao longo do tempo por vários mecanismos (SOLOMON *et al.*, 2008).

Pacientes com tumores de ovário sensíveis a platina têm uma sobrevida média de dois anos, com um intervalo de três meses a mais de dez anos. Já nos tumores resistentes a platina, a sobrevida média é de 9 a 12 meses, e menos de 15% das pacientes respondem a quimioterapia subsequente, sendo que quase todas as pacientes com carcinoma seroso de alto grau que desenvolvem quimiorresistência a platina sucumbem à doença (DAVIS; TINKER; FRIEDLANDER, 2014).

O mecanismo de resistência à cisplatina desenvolvido pelas células tumorais são múltiplos e complexos. Contudo, mecanismos envolvidos no reparo do DNA têm sido atribuídos como o maior fator da resistência. Outros fatores se devem a absorção reduzida da cisplatina pelas células, ou aumento do efluxo (DAMIA; BROGGINI, 2019; DAVIS; TINKER; FRIEDLANDER, 2014).

Os mecanismos de resistência ao paclitaxel também são complexos, multifatoriais e não são totalmente compreendidos. O mecanismo mais comum é o efluxo da droga através das proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) tal como a glicoproteína-P. Outros fatores se devem a hipóxia crônica no microambiente do tumor devido ao fluxo sanguíneo irregular, que cria um estado hipóxico e ácido, reduzindo a quimiossensibilidade, assim como mutações no gene da  $\beta$ -tubulina (KAMPAN *et al.*, 2015).

Contudo, apesar das evidências da considerável heterogeneidade do perfil molecular e fenótipo histológico, a maioria dos casos de CO é tratada indiscriminadamente (KHAIDER *et al.*, 2012).

A heterogeneidade das células tumorais leva a variações moleculares nas vias de sinalização, como ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e mutações genéticas que garantem a sobrevivência celular (POKHRIYAL *et al.*, 2019).

Apesar do CO apresentar uma baixa prevalência, sua taxa de mortalidade é três vezes maior do que o câncer de mama. Além disso, o diagnóstico tardio faz com que os tratamentos disponíveis não sejam tão efetivos, assim, a necessidade de novas drogas mais efetivas a fim de melhorar o prognóstico e taxa de sobrevida das pacientes é de extrema importância (CHAMANI *et al.*, 2020; VERGOTE, 2014)

O ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) foi caracterizado e descrito em 1995 por Wiley e colaboradores (WILEY *et al.*, 1995). TRAIL é uma proteína transmembranar do tipo II (porção N-terminal intracelular e porção carboxi-terminal extracelular) codificada pelo gene *TNFSF10* localizado no cromossomo humano três na posição 3q26. Esta proteína consiste em 281 aminoácidos e em sua forma madura apresenta peso molecular de 41kDa, possuindo um sítio de clivagem no domínio extracelular o qual libera um fragmento solúvel de 24kDa (WANG, Q. *et al.*, 2000).

TRAIL tem a capacidade de induzir a apoptose em células tumorais, mas não em células normais, tornando esta proteína um promissor agente antitumoral seletivo. Testes clínicos de fase I/II foram feitos, entretanto, foi observado uma atividade anti-tumoral limitada e muitos tumores primários apresentavam resistência a monoterapia com TRAIL humano recombinante solúvel e também aos anticorpos agonistas de TRAIL (VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017; YUAN, Z. Q. *et al.*, 2015)

TRAIL é expresso por uma variedade de células do sistema imune inato e adaptativo e essa expressão é dependente de estímulo. Em monócitos e macrófagos, o aumento da expressão de TRAIL se dá após o estímulo com lipopolissacarídeos (LPS) e interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). Já o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) é capaz de aumentar a expressão de TRAIL em células dendríticas, células *natural killer* (NK) e também em monócitos (FALSCHLEHNER; SCHAEFER; WALCZAK, 2009). Assim, observa-se que TRAIL tem um papel importante em suprimir o crescimento de células tumorais através de células NK dependente de IFN- $\gamma$ . Foi demonstrado que mulheres em período de amamentação produzem altos níveis de TRAIL em seu leite, o qual contribui para efeitos anticâncer em bebês (ZAULI *et al.*, 2013).

TRAIL pode se ligar a quatro receptores dispostos na membrana celular e que se dividem em duas subclasses: os receptores que apresentam um domínio de morte citoplasmático completo e são capazes de ativar apoptose (TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5), e os receptores que apresentam um domínio intracitoplasmático inexistente ou truncado (TRAIL-R3/DcR1 e TRAIL-R4/DcR2).

Apesar da expressão do RNA mensageiro (mRNA) desses receptores ser detectado em ambos tecidos normais e malignos, as células normais parecem ser menos responsivas a TRAIL pelo fato de expressarem em maior abundância os receptores TRAIL-R3 e TRAIL-R4 em comparação às células tumorais (ZHANG, X. D. *et al.*, 2000). Os receptores TRAIL são transcricionalmente regulados pela proteína tumoral p53, e agentes quimioterápicos potencializam a morte celular em células *wild-type* p53, devido ao aumento da expressão de TRAIL-R1/R2 na superfície da membrana plasmática (WILLMS *et al.*, 2019).

TRAIL forma um homotrímero que se liga a três receptores que também sofrem trimerização, o hexâmero formado pela proteína e seus receptores é estabilizado pela ligação de um íon de  $Zn^{2+}$  conferindo a bioatividade dessa proteína. A ligação de um homotrímero de TRAIL a um trímero de receptores induz uma mudança conformacional na superfície da célula, levando também a um rearranjo espacial dos domínios de morte intracelulares, levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras. Acontece então o recrutamento de FADD e pro-caspase 8, formando DISC (complexo de sinalização indutor de apoptose), que irá culminar na clivagem e ativação da pro-caspase 8 em caspase-8, levando a execução da cascata apoptótica (NAVAL *et al.*, 2019).

O receptor TRAIL-R3 não apresenta domínio intracitoplasmático, e o receptor TRAIL-R4 apresenta um domínio intracitoplasmático truncado, que não ativa apoptose, mas em contrapartida ativa vias de sobrevivência como NF- $\kappa$ B e/ou morte inflamatória por necroptose.

Além de sinalizar apoptose após a ligação de TRAIL, os receptores TRAIL-R1 e TRAIL-R2 também são capazes de induzir a ativação de NF- $\kappa$ B, família de fatores de transcrição composta por cinco proteínas (DEY; TERGAONKAR; LANE, 2008; FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

O NF- $\kappa$ B é descrito como um regulador de fatores de transcrição, composto por homo ou heterodímeros a partir de um conjunto de cinco proteínas: NF- $\kappa$ B1(p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB, e c-Rel (Rel) (GHOSH; DASS, 2016). Estas podem produzir mais de 15 complexos distintos ativos, entre os quais o heterodímero p50/p65 é o mais abundante e está presente em quase todas as células (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

A ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TRAIL se dá através do recrutamento da proteína RIPK1 ao domínio intracitoplasmático dos TRAIL-R. Esta proteína ativa o complexo de quinases I $\kappa$ B (IKK), levando a fosforilação da proteína inibidora de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) e sua degradação. Em células não estimuladas, NF- $\kappa$ B é isolado no citoplasma, ligado à sua proteína regulatória I $\kappa$ B. A degradação dessa proteína leva a dissociação do complexo NF- $\kappa$ B:I $\kappa$ B e, conseqüentemente sua translocação para o núcleo (GODWIN *et al.*, 2013; WEINLICH; GREEN, 2014). Os fatores de transcrição de NF- $\kappa$ B regulam genes anti-apoptóticos como *BCL-2* (*B-cell lymphoma 2*) genes mitogênicos como *c-MYC* (*MYC Proto-Oncogene*) e *CCND1* (*Cyclin D1*), além de promover a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que constituem o microambiente tumoral (GIULIANI; BUCCI; NAPOLITANO, 2018). Sendo assim, a ativação constitutiva dos fatores de transcrição da via NF- $\kappa$ B têm sido associada a vários aspectos da progressão tumoral (PARK; HONG, 2016).

Como já descritos anteriormente, os receptores de morte TRAIL-R1/R2 são capazes de sinalizar apoptose, mas também sinalizam outro tipo de morte celular: a necroptose (NAOUM *et al.*, 2017).

A necroptose é uma necrose programada mediada por receptores de morte que tem sido elucidada na última década e que é mediada através de *RIPK1* (*receptor-interacting protein kinase 1*), *RIPK3*, e *MLKL* (*mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase*), sendo ativada sobre condições deficientes da apoptose (SHAN *et al.*, 2018). A ativação da caspase 8 mediada pelos receptores de morte TRAIL inativam as proteínas RIPK1 e RIPK3 através de clivagem proteolítica e inicia a sinalização da cascata apoptótica. Entretanto, na ausência de caspase 8, RIPK1 e RIPK3 são fosforilados e subseqüentemente fosforilam MLKL, que é translocado para a membrana plasmática, perturbando a integridade da célula (DHURIYA; SHARMA, 2018; NAOUM *et al.*, 2017; WANG, T. *et al.*, 2017).

A necroptose é considerada uma morte celular inflamatória, devido à liberação de DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano) intracelulares. A inflamação induzida por DAMPs pode ativar a via de NF- $\kappa$ B (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Por outro lado, a liberação de DAMPs pelas células tumorais necroptóticas pode promover a maturação de células dendríticas, as quais ativam células T CD8<sup>+</sup> através de apresentação-cruzada no microambiente tumoral, induzindo assim, imunidade anti-tumoral (MENG *et al.*, 2016). Sendo assim, a necroptose desempenha um papel duplo por apresentar efeitos anti e pró-tumorais, e este papel parece ser dependente do tipo, estágio e grau do tumor, além do balanço entre as proteínas RIPK1, RPK3 e MLKL (QIN *et al.*, 2019).

É importante notar que a sinalização induzida por TRAIL nem sempre irá culminar em apoptose nas células tumorais. Por exemplo, no DISC, uma variante homóloga da caspase 8 chamada cFLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) que não possui resíduo catalítico para sua atividade inibe a ativação da caspase 8, e por conseguinte o sinal apoptótico (STUCKEY; SHAH, 2013). Quando cFLIP se liga ao domínio intracitoplasmático e inibe a ativação de caspase 8, tanto as vias de NF- $\kappa$ B e necroptose podem ser desencadeadas. O tratamento de células tumorais resistentes a TRAIL com quimioterápicos como cisplatina, resulta na baixa expressão de cFLIP e re-sensibiliza as células a TRAIL (REFAAT; ABD-RABOU; REDA, 2014; SAFA; POLLOK, 2011).

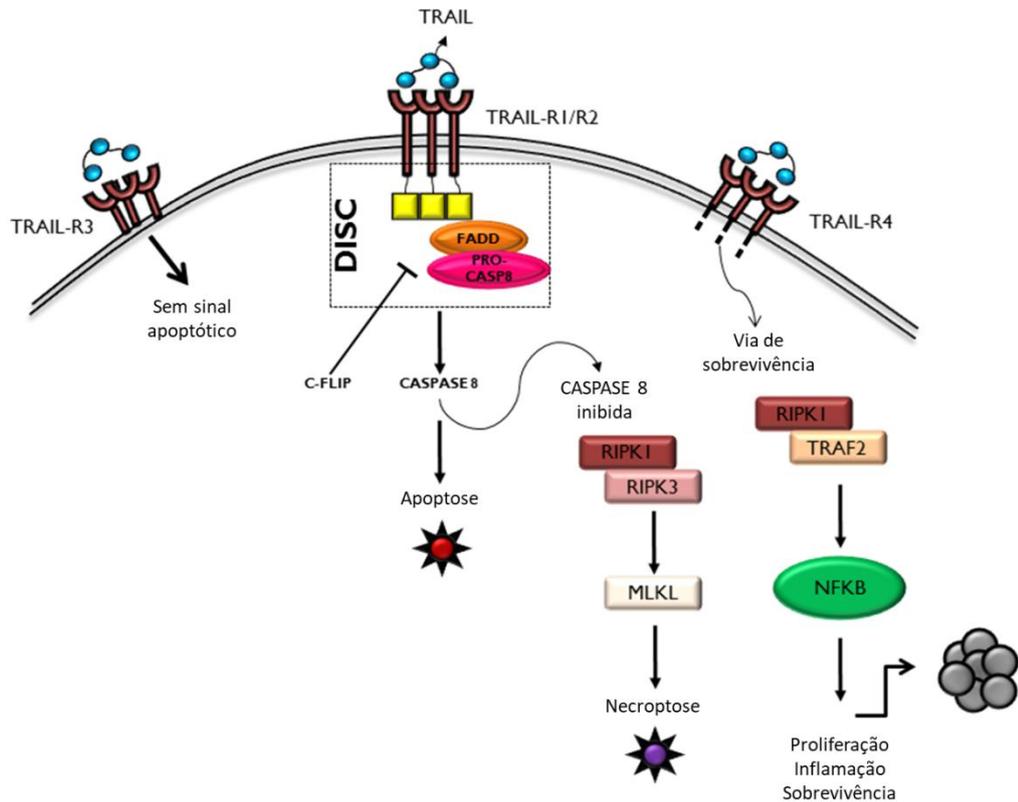


Figura 1: Vias de sinalizações ativadas por TRAIL. O Ligante Indutor de Apoptose relacionado ao Fator de Necrose Tumoral – TNF (TRAIL) pode se ligar a quatro receptores dispostos na superfície da membrana celular. Os receptores de morte TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5) apresentam um domínio de morte (DD) intracitoplasmático. Quando TRAIL se liga, as proteínas FADD e pro-caspase 8 são recrutadas formando o Complexo de Sinalização Indutor de Morte (DISC) ativando caspase-8 e sinalizando para a apoptose. A proteína c-FLIP é um homólogo de caspase 8 sem atividade catalítica e tem a capacidade de inibir a formação de DISC. Quando isso acontece, a proteína RIPK1 pode ser recrutada para o DD e sinalizar para necroptose ou a via de NF-κB. O receptor TRAIL-R3 (DcR1) não possui domínio intracitoplasmático e não sinaliza a morte nas células. O receptor TRAIL-R4 (DcR2) possui um domínio intracitoplasmático truncado e não sinaliza para apoptose, mas pode recrutar RIPK1 e sinalizar para necroptose, assim como para a via de NF-κB também. Fonte: autoria própria.

Além da ativação de morte inflamatória e vias de sinalizações envolvidas na progressão tumoral pelos receptores de morte TRAIL, a célula desenvolveu outros mecanismos que desviam da via canônica (evadir a apoptose).

Tem sido demonstrado que os receptores de morte TRAIL (TRAIL-R1/R2) além de dispostos na superfície da membrana, também pode estar localizados no citoplasma e núcleo das células, sendo que sua função no citoplasma ainda não foi elucidada (GUNDLACH *et al.*, 2018). Poucos estudos têm mostrado a relevância da internalização dos receptores TRAIL-R1/R2, mas assim como sua localização no citoplasma, sua localização nuclear tem sido relacionada com mecanismos de resistência anti-apoptóticos. Foi demonstrado que a presença de TRAIL-R2 no núcleo (nTRAIL-R2) está ligada ao processo de maturação de microRNA (miRNA). Em diferentes tipos celulares tumorais, nTRAIL-R2 interage com o

complexo microprocessador Drosha. Através dessa interação, nTRAIL-R2 inibe a maturação do miRNA let-7, e conseqüentemente aumenta os níveis de expressão dos alvos Lin28B e HMGA2 de let-7. As proteínas Lin28B e HMGA2 são altamente expressas em tecidos embrionários e pouco expressas em tecidos diferenciados, a baixa expressão do miRNA let-7 faz com que essas proteínas voltem a ser expressas nos tumores que é positivamente correlacionado com a progressão tumoral (BERTSCH *et al.*, 2014).

Outro mecanismo de resistência desenvolvido pelas células se dá através da endocitose mediada por receptor. A ligação de TRAIL a seus receptores de morte TRAIL-R1/R2 estimula sua internalização via endocitose mediada por clatrina (CME). Após a ligação, a clivagem/ativação de caspase 8 leva a liberação de cálcio mediada por receptores de rianodina, levando a ativação da dinamina-1 que irá promover a endocitose do complexo TRAIL-TRAIL-R. Esta regulação suprime a morte celular mediada por TRAIL em células tumorais (REIS *et al.*, 2017). A eficácia de TRAIL em promover apoptose através dos receptores de morte é limitada através dos diversos mecanismos de resistência que são desenvolvidos pelas células tumorais.

Mesmo com os diversos mecanismos de resistência que as células desenvolvem, um dado importante é que numa temperatura de 37°C, TRAIL se liga com maior afinidade ao receptor TRAIL-R2 em relação aos outros receptores. É provável que em condições fisiológicas, a ligação preferencial por TRAIL-R2 seja favorável tendo em vista que a concentração de TRAIL endógeno é limitada (VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017).

Por fim, os receptores de morte TRAIL também podem ser negativamente regulados através do sistema ubiquitina-proteassoma. Este complexo resulta na adição de moléculas de ubiquitina aos resíduos de lisina de proteínas que serão degradadas pelo proteassoma (complexo multiprotéico que hidrolisa proteínas marcadas com ubiquitina em pequenos fragmentos peptídicos). As ubiquitinas ligases c-Cbl e MARCH estão envolvidas na mono-ubiquitinação dos receptores TRAIL-R1/R2 após ativação, resultando na degradação de receptores internalizados e contribuindo para a redução dos níveis de receptores seguidos de ativação e, por conseguinte resistência a apoptose (SARHAN; D'ARCY; LUNDQVIST, 2014).

A partir do exposto, observa-se que o sistema TRAIL-TRAIL-R pode exercer um papel de grande importância no mecanismo de morte, sobrevivência, quimiorresistência e imunidade tumoral no câncer, e sua elucidação está diretamente relacionado ao melhor entendimento de novas abordagens mais assertivas para o tratamento desta doença. A resistência dos tumores aos quimioterápicos leva à falha terapêutica e morte em mais de 90% das pacientes com a doença em estágios avançados. O pobre prognóstico é frequentemente associado à recidiva

e metástase e, portanto, a avaliação do perfil de expressão gênica é amplamente usada na identificação de marcadores preditivos que possam auxiliar na escolha do melhor tratamento (GUPTA *et al.*, 2017). Diante disso, uma abordagem relevante a ser considerada para a otimização de resultados clínicos para o tratamento do CO é o estudo da biologia desses tumores, a fim de obter uma assinatura genética que possibilite a prática da medicina personalizada (LAVOUÉ *et al.*, 2017).

Os tumores de ovário podem ser divididos em duas classes na clínica de acordo com Kurman e Shih (2010). Os tumores do tipo I geralmente apresentam mutações nos genes *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1* e *ARID1A*, já os tumores do tipo II apresentam mutações no gene *TP53*. A linhagem celular SKOV-3 é classificada pela ATCC como um adenocarcinoma (metástase), sem especificação do subtipo histológico retirada de ascite e que compartilha mutações características tanto de tumores do tipo I (mutações em *PIK3CA* e *ARID1A*) quanto de tumores do tipo II (com mutação em *TP53*). Além disso, essa linhagem é descrita como platino-resistente, sendo a quimiorresistência a característica mais importante a ser elucidada para os tumores de ovário e o foco deste trabalho, já que a recidiva da doença está diretamente relacionada a esta característica (CUNNEA; STRONACH, 2014). Considerando a heterogeneidade genética descrita também em amostras clínicas de tumores ovarianos, pode se afirmar que esta linhagem constitui uma boa representação para estudos não clínicos sobre a resposta desse tipo de tumor ao tratamento.

## 2. OBJETIVO GERAL

Analisar a participação da via de morte e sobrevivência celular mediada pelo sistema TRAIL/TRAIL-R e sua relação na quimiorresistência com ensaios *in vitro* utilizando linhagem celular tumoral de ovário SKOV-3.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a sobrevivência da linhagem celular SKOV-3 após os tratamentos com cisplatina, rhTRAIL e a combinação destes;
2. Determinar o fenótipo da linhagem celular SKOV-3 para os receptores TRAIL-R2 e TRAIL-3;
3. Avaliar o perfil de expressão de genes envolvidos na apoptose e necroptose frente ao tratamento com cisplatina, rhTRAIL e a combinação destes na linhagem celular SKOV-3;
4. Avaliar a regulação transcricional dos receptores tipo TRAIL frente ao tratamento com cisplatina, rhTRAIL e a combinação destes na linhagem celular SKOV-3;
5. Silenciar gene *TRAIL-R2* e determinar seu papel na morte celular *in vitro* na linhagem celular SKOV-3.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem celular de tumor de ovário SKOV-3 (Adenocarcinoma de ovário – ascite / ATCC #CRL-HTB-77™) foi obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivada em meio DMEM Alta Glicose (Gibco, USA, cat. 12100-046) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, cat. 12657-029) a temperatura de 37°C e atmosfera enriquecida com 5% CO<sub>2</sub>. A linhagem celular SKOV-3 foi descongelada de acordo com as condições pré-estabelecidas pelo procedimento operacional padrão (POP) do laboratório. Em seguida, foram submetidas aos procedimentos adequados, como repique e troca de meio de cultura. Após sua expansão, foram congeladas e armazenadas em tanque de criopreservação e registradas como componentes do banco de células. Durante os experimentos, as células foram submetidas a procedimentos de repique celular toda vez que atingiam confluência em torno de 80-90%. Sabe-se que o número de passagens pode alterar as características de uma linhagem celular ao longo do tempo, assim sendo, foram utilizadas passagens entre 71-73 a fim de se obter reprodutibilidade nos ensaios.

#### 3.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular na presença do quimioterápico cisplatina e da proteína humana recombinante TRAIL (rhTRAIL) foi determinada utilizando o método brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Esse ensaio baseia-se na capacidade das células vivas de reduzir o reagente MTT por meio da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. A redução deste sal origina o formazan, um cristal de cor violácea insolúvel em água, mas que pode ser solubilizado por solventes orgânicos, possibilitando a leitura colorimétrica por espectrofotometria (LOBNER, 2000; MOSMANN, 1983). A redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, portanto, determina a viabilidade celular, a partir da qual será possível determinar o perfil dose-resposta, e a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>).

As células foram *tripsinizadas* e semeadas em triplicatas ( $2,5 \times 10^4$  por poço) em placas de 96 poços e incubadas a 37°C em incubadora com atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 5%. Após 24 h, ao verificar o crescimento em monocamada nos poços, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS 1X (100µL/poço) e novamente incubadas, durante 24 horas, com diferentes concentrações das drogas (cisplatina, rhTRAIL e a combinação destes). Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e as células foram novamente lavadas com PBS 1X e adicionado MTT em meio sem suplementação (100µL/poço) a 0,5 mg/mL. Foi feita nova incubação por 3 horas e após esse período a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1000rpm, o sobrenadante retirado

e adicionado 100  $\mu$ L/poço de DMSO (Dimetilsulfóxido) a fim de solubilizar os cristais de formazan. Finalmente, a leitura da absorbância (550nm) foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® M5e). As concentrações iniciais usadas como referência para determinação da IC<sub>50</sub> de cisplatina e rhTRAIL sobre a linhagem celular foram obtidas a partir de uma revisão da literatura e modificadas a partir dos resultados obtidos.

A determinação da IC<sub>50</sub> das drogas testadas foi calculada pelo programa estatístico Dr Fit (DI VEROLI *et al.*, 2015).

### 3.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Após a determinação das concentrações equivalentes à IC<sub>50</sub> das drogas, as células foram semeadas ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) em triplicatas em placas de seis poços e incubadas a 37°C em incubadora com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1X (1000 $\mu$ L/poço), em seguida, foi aplicada a cisplatina e rhTRAIL nas concentrações da IC<sub>50</sub> diluídos em meio de cultura próprio para cada linhagem suplementado com 1% de SFB, e a placa foi novamente incubada. Como controle, foi feita a extração das células sem tratamento. Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e realizado a extração do RNA total. Para a extração foi utilizado o *RNeasy® Mini Kit* (cat. 74104, GER), de acordo com as instruções do fabricante. O sobrenadante foi colhido, e as células foram *tripsinizadas* e centrifugadas por 5 minutos a 1000 x g. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente por 5 minutos a 1000 x g. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado ao pellet de células 350 $\mu$ L do tampão RLT a fim de romper a membrana das células. Após homogeneização, foi observada uma textura viscosa. O lisado celular foi transferido para uma coluna *QIAshredder* e centrifugado por 2 minutos a 10.000 x g. Logo em seguida foi adicionado 350 $\mu$ L de álcool 70% ao lisado e homogeneizado bem. Os 700 $\mu$ L da amostra foi transferido para uma nova coluna *Rneasy Mini spin* junto a um tubo coleta e centrifugado por 15 segundos a 8.000 x g. Após a centrifugação, o fluxo foi descartado e o RNA mantido na membrana da coluna. Foi adicionado 700 $\mu$ L do tampão RW1 à coluna e centrifugado por 15 segundos a 8.000 x g. O fluxo foi descartado e adicionado 700 $\mu$ L de tampão RPE à coluna e centrifugado por 15 segundos a 8.000 x g. O fluxo foi descartado, adicionado novamente 500 $\mu$ L do tampão RPE e centrifugado por 2 minutos a 8.000 x g para lavar a membrana da coluna. O fluxo foi descartado juntamente ao tubo de coleta, e a coluna *RNeasy Mini spin* foi colocada em um novo tubo de coleta e centrifugada por 1 minuto a 10.000 x g para a secagem da membrana. Logo em seguida, o tubo de coleta foi descartado e adicionado 30 $\mu$ L de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna e centrifugado por 1 minuto a 10.000 x g para eluição do RNA. O RNA obtido foi armazenado a -80°C até sua utilização.

### **3.4 QUANTIFICAÇÃO DO RNA**

A quantificação do RNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro de microvolume Nanovue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life, USA) utilizando-se 2µL da amostra. Os seguintes parâmetros foram avaliados na quantificação: concentração, absorvância a 280 nm, absorvância a 260 nm e razão das absorvâncias 280/260. Considerou-se a relação (260/280) igual ou maior que 1,9 como referência para o uso.

### **3.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA**

A integridade do RNA total extraído foi avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. Foram pesados 0,5 g de agarose para ser diluída em 50 mL de TBE 1X. Foi adicionado 50µl de brometo de etídio e a solução gelificou no suporte para o gel com o pente de canaleta inserido. As amostras foram preparadas para aplicação no gel com os seguintes parâmetros: 0,5 µg de RNA, 5 µL de tampão de amostra e água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para um volume final de 10 µL. Após a gelificação do gel, o pente de canaletas foi retirado, o gel posicionado na cuba de eletroforese, e a cuba preenchida com TBE 1X. As amostras foram aplicadas em cada canaleta. A eletroforese foi realizada submetendo o gel a uma voltagem de 100 Volts durante 1 hora (SAMBROOK; RUSSELL, 2006). O RNA foi visualizado através do foto documentador ChemiDoc System (Bio-Rad). A presença de duas bandas, correspondentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal íntegras e sem arraste foi determinante para se considerar as amostras com qualidade para continuidade dos experimentos.

### **3.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE**

Foi tratado 2 µg de RNA total com o kit RNase-FreeDNase Set® (Qiagen, USA, Cat. 79254) conforme as instruções do fabricante. Em um microtubo foi acrescentado 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão RDD e 0,2 µL de DNase. O volume foi completado com água tratada com DEPC em quantidade suficiente para 20 µL. A amostra foi incubada por 30 minutos a 37°C, e em seguida, por 5 minutos a 65°C para inativação da enzima. Após as incubações, o RNA total purificado foi armazenado a -80°C.

### **3.7 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR**

As amostras tratadas foram retrotranscritas em DNA complementar (cDNA) ao RNA mensageiro, a partir do kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, cat. 18080-400), conforme as orientações do fabricante (Tabela 1). O procedimento de síntese de cDNA foi realizado 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, todos os materiais foram expostos à luz UV por

20 minutos. Os tubos utilizados foram identificados de acordo com as amostras de RNA. Os reagentes Oligo d(T), *Annealing Buffer*, Água livre de RNase/DNase e 0,6µg de RNA total foram homogeneizados por pipetagens e aquecidos em banho seco por 5 minutos a 65°C. Os mirotubos foram retirados do banho seco e resfriados por 3 minutos e em seguida foram adicionados o *2X First-Strand Reaction Mix* e a enzima *SuperScript III*. As amostras foram levadas ao termociclador por 50 minutos a 50°C e em seguida por 5 minutos a 85°C. Foi sintetizado 20µL de cDNA e 20uL de controle de contaminação por DNA genômico, no qual não foi incluída a enzima: NORT. O cDNA e NORT sintetizados foram armazenados a -20°C.

Tabela 1: Concentrações e volumes a serem utilizados na reação de síntese de cDNA

Reagente	Volume
Oligo d(T) 0,5µg/µL	1 µL
Annealing Buffer	1 µL
Água livre de RNase/DNase	1 µL
RNA tratado 0,6µg	6 µL
2X First-Strand Reaction Mix	10 µL
SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	2 µL

### 3.8 OTIMIZAÇÃO DOS INICIADORES

Os *iniciadores* utilizados neste trabalho foram retirados do banco de dados *PrimerBank* (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) ou desenhados na ferramenta on-line *PrimerQuest Tool* (Integrated DNA Technologies, IDT) e sua autenticidade foi certificada pela ferramenta *Primer BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A concentração ideal de cada par de iniciadores a ser utilizada nas reações de RT-qPCR foram determinadas através das combinações de 150nM, 200nM, 250nM e 300nM. As concentrações ideais para cada par de iniciadores foram baseadas no menor Ct (ciclo de Threshold) e na presença de um único produto de amplificação na curva de dissociação.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos genes *TNFRSF10A/TRAIL-R1* (*TNF receptor superfamily member 10a*), *TNFRSF10B/TRAIL-R2* (*TNF receptor superfamily member 10b*), *TNFRSF10C/TRAIL-R3* (*TNF receptor superfamily member 10c*), *TNFRSF10D/TRAIL-R4* (*TNF receptor superfamily member 10d*), *RIPK1* (*receptor interacting serine/threonine kinase 1*), *MLKL* (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), *NFKB1* (*nuclear factor kappa B subunit 1*), *REL-A* (*RELA proto-oncogene, NF-kB subunit*), *TP53* (*tumor protein p53*), *CASP8* (*caspase 8*) e *CFLAR* (*CASP8 and FADD like apoptosis regulator*) foi avaliada através de PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR). Utilizou-se GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, cat.A6001),

conforme especificações do fabricante (Tabela 3). Os genes *RPL13A* (*ribosomal protein L13a*) e *ALAS1* (*5'-Aminolevulinate Synthase 1*) foram utilizados como normalizadores por serem expressos constitutivamente nas células. O procedimento foi realizado 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. Todos os materiais foram expostos à luz UV por 20 minutos. Os reagentes foram homogeneizados em tubo estéril sobre o suporte de resfriamento *Coolbox* (Biocison, USA). Os reagentes foram distribuídos, em duplicata, em cada poço de uma placa de 96 poços. Após adição de reagentes, em outra câmara de fluxo unidirecional exclusiva para DNA, foi adicionado 60 ng de cDNA das amostras em seus respectivos poços e seus NORT correspondentes para a verificação de contaminação por DNA genômico (gDNA). Controles sem DNA foram incluídos na reação para certificar a contaminação dos reagentes. A amplificação e coleta dos dados foram realizadas pelo equipamento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foi utilizado o método 2 elevado à (-Delta-Delta C(T)) ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) para determinar a quantificação relativa da expressão de cada alvo. Este método analisa as mudanças na expressão gênica da amostra tratada para o gene de interesse em relação à mesma amostra não tratada, considerando um gene de expressão constitutiva como gene normalizador.

Tabela 2: Condições de ciclagem para RT-qPCR

Passo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação da polimerase	1	95°C	2 minutos
Desnaturação		95°C	15 segundos
Anelamento e extensão	40	60°C	1 minuto

Tabela 3: Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR

Gene	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Tamanho do produto	Concentração FW/RV	Temperatura de anelamento	Referência
<i>TNFRSF10A (TNF receptor superfamily member 10a)</i>	FW GGATGGTCAAGGTCAAGGATT RV CAGCAACGGAACAACCAAAG	119pb	250/300	60°C	PrimerQuest Tool (IDT)
<i>TNFRSF10B (TNF receptor superfamily member 10b)</i>	FW GCCCCACAACAAAAGAGGTC RV AGGTCATTCCAGTGAGTGCTA	128pb	250/200	60°C	PrimerBank ID 224494018c2
<i>TNFRSF10C (TNF receptor superfamily member 10c)</i>	FW ACCAACGCTTCCAACAATGAA RV CTAGGGCACCTGCTACACTTC	173pb	200/300	60°C	PrimerBank ID 301898781c2
<i>TNFRSF10D (TNF receptor superfamily member 10d)</i>	FW GCCTCTCCCTATCACTACCTTAT RV GCAGATGCCTTTGAGGTAAGA	114pb	250/250	60°C	PrimerQuest Tool (IDT)
<i>RIPK1 (receptor interacting serine/threonine kinase 1)</i>	FW GACGAAGCCAACCTACCATCTT RV TCTCCTTTCTCCTCTCTGTT	99pb	300/300	60°C	PrimerQuest Tool (IDT)
<i>MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase)</i>	FW AGGAGGCTAATGGGGAGATAGA RV TGGCTTGCTGTTAGAAACCTG	70pb	300/200	60°C	PrimerBank ID 215820620c1
<i>NFKB1 (nuclear factor kappa B subunit 1)</i>	FW GAAGCACGAATGACAGAGGC RV GCTTGCGCGATTAGCTCTTTT	137pb	250/300	60°C	PrimerBank ID 259155300c2
<i>RELA (RELA proto-oncogene, NF-kB subunit)</i>	FW GTGGGGACTACGACCTGAATG RV GGGGCACGATTGTCAAAGATG	121pb	300/300	60°C	PrimerBank ID 223468680c3
<i>TP53 (tumor protein p53)</i>	FW GTACCACCATCCACTACAACACTAC RV CACAAACACGCACCTCAAAG	141pb	150/250	60°C	PrimerQuest Tool (IDT)
<i>CASP8 (caspase 8)</i>	FW GTTGTGTGGGGTAATGACAATCT RV CCATTCTGTCCCTAATGCTG	183pb	300/300	60°C	PrimerBank ID 1403331a3
<i>CFLAR (CASP8 and FADD like apoptosis regulator)</i>	FW GACAGAGCTTCTTCGAGACAC RV GCTCGGGCATAAGGCAAAT	116pb	250/300	60°C	PrimerBank ID 2429154a2
<i>RPL13A (ribosomal protein L13a)</i>	FW GCCCTACGACAAGAAAAAGCG RV TACTTCCAGCCAACCTCGTGA	117pb	300/300	60°C	PrimerQuest Tool (IDT)
<i>ALAS1 (5'-Aminolevulinat Synthase 1)</i>	FW AGGCCAAGGTCCAACAGACT RV TCCTCACGGCATTTCATTCCT	210 pb	300/300	60°C	PrimerBank ID 362999012c3

### 3.10 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A caracterização das linhagens celulares em relação aos receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3 foram realizadas com os anticorpos Human TRAIL R2/TNFRSF10B Alexa Fluor® 488-conjugated (FAB6311G) e Human TRAIL R3/TNFRSF10C Alexa Fluor® 647-conjugated (FAB6302R) e seus respectivos isotipos Mouse IgG2B Alexa Fluor® 488-conjugated Isotype Control e Mouse IgG1 Alexa Fluor® 647-conjugated Antibody, adquiridos pela R&D Systems. As células foram cultivadas e após *tripsinização*, lavadas com PBS 1X e ressuspensas em tampão de lavagem (PBS 1X + 0,1% de azida sódica + 1% SFB) ( $1 \times 10^6$  células/100µl). Em seguida, foram adicionados os anticorpos e respectivos isotipos na concentração recomendada pelo fabricante. Os anticorpos foram incubados por 1h protegidos da luz. As células marcadas foram lavadas e ressuspensas em 400µL de PBS 1X e em seguida analisadas no equipamento FACSCanto II (BD Bioscience) utilizando o software FACSDiva 6.1.3.

### 3.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A linhagem celular SKOV-3 foi semeada ( $1 \times 10^5$ ) em placa de 24 poços e incubada por 24h. Após a incubação, as células foram fixadas com formaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente (TA) e lavadas três vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram incubadas com tampão de bloqueio (10% soro fetal bovino, 1% de albumina bovina em PBS 1X) durante 1 hora. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com os anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio durante 1h. Os anticorpos utilizados foram Human TRAIL R2/TNFRSF10B Alexa Fluor® 488-conjugated (R&D Systems, Cat. FAB6311G) e Human TRAIL R3/TNFRSF10C Alexa Fluor® 647-conjugated (R&D Systems, Cat. FAB6302R). Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e o núcleo celular foi corado com 4,6-diaminidino-2-phenylindole - DAPI (Molecular Probes, Cat. # D13061) na concentração de 300nM por 5min. Nos ensaios para verificar a presença dos receptores no citoplasma ou núcleo, as células foram permeabilizadas com PBT (0,1 % de Triton X-100 em PBS 1X) por 10 min antes da incubação com o tampão de bloqueio e as soluções utilizadas foram preparadas em PBT ao invés de PBS 1X. Para avaliar a estrutura da célula, também foi utilizada a marcação com Faloidina Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Cat. #A12379). As células marcadas foram visualizadas no microscópio invertido de fluorescência AxioVert 200 (Zeiss).

### 3.12 SILECIAMENTO ALVO TRAIL-R2

A fim de se avaliar o papel do gene TRAIL-R2 no mecanismo de quimiorresistência, realizou-se o silenciamento pelo mecanismo de interferência por RNA (RNAi) através do *Silencer™ Select* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O mecanismo de RNAi pode

ser classificado de acordo com sua origem e função em três categorias: miRNAs (*microRNAs*), siRNAs (*short interfering RNAs*) e shRNAs (*short hairpin RNAs*). O RNAi escolhido para esta metodologia foi o siRNA. Os siRNAs são moléculas sintéticas de fita dupla de RNA de aproximadamente 20-30pb que se pareiam a sequências de RNA que são complementares as suas, levando a degradação do RNA mensageiro alvo (figura 2). Foram semeadas  $0,25 \times 10^6$  células por poço em placa de seis poços. Após a aderência, as células foram lavadas com PBS 1X e adicionado meio Opti-MEM™ Reduced-Serum (Gibco, cat. 22600-050) suplementado com 5% de SFB. Para o silenciamento do alvo TRAIL-R2 foram utilizados dois Silencer® Select TNFRSF10B (cat. 4390824 e cat. 4392420) (Tabela 4), um controle positivo Silencer™ Select GAPDH (cat. 4390849) e um controle negativo Silencer™ Select (cat. 4390843). Cada reação foi preparada individualmente em microtubos. Foi realizada a diluição de 9µL da Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, cat. #13778150) em 150µL de meio Opti-MEM™. Em outro microtubo, 3µL (30pmol) de cada siRNA foi diluído em 150µL de meio Opti-MEM™. Logo em seguida os siRNAs diluídos foram adicionados aos microtubos com a lipofectamina diluída e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, o complexo siRNA-lipofectamina foi adicionado na placa com as células em seus poços correspondentes e incubadas por 24-72h em estufa a temperatura de 37° e atmosfera enriquecida com 5% CO<sub>2</sub>. O ensaio foi realizado em duplicata técnica. A avaliação do silenciamento foi feito através da técnica de RT-qPCR a partir de sondas TaqMan® Assays TNFRSF10B (Thermo Fisher, cat. 4331182, Assay ID Hs00366278\_m1) e TaqMan® Assays GAPDH (Thermo Fisher, cat. 4331182, Assay ID Hs02758991\_g1). Utilizou-se TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems, cat.4440038), conforme especificações do fabricante.

Tabela 4: Relação dos siRNAs utilizados no ensaio de silenciamento

siRNA	Sequência 5' – 3'	ref-seq	id
TRAIL-R2 #1	CUGAUAAAGUGGGUCAACATT UGUUGACCCACUUAUCAGCA	NM_003842	s16756
TRAIL-R2 #2	GGGACACCUUGUACACGAUTT AUCGUGUACAAGGUGUCCCTG	NM_003842	s16757

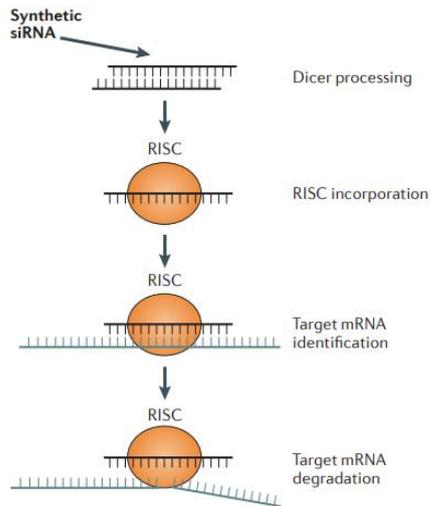


Figura 2: Mecanismo de silenciamento por siRNA. Os siRNAs sintéticos escapam do processamento por Dicer e podem ir direto para o complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC) e mediar o reconhecimento de mRNA alvos através do pareamento de bases. A proteína Argonata2 presente no complexo RISC cliva o mRNA alvo levando ao silenciamento. Fonte: Wittrup; Lieberman, 2015 (modificado).

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa SPSS 19.0 (IBM) para realizar a análise entre os grupos pelo método LSD Post Hoc (ANOVA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O efeito citotóxico da cisplatina sozinha e em combinação com rhTRAIL sobre a linhagem celular SKOV-3 foi demonstrado em ensaios de viabilidade celular utilizando o reagente MTT. As concentrações de cisplatina utilizadas foram de 250 $\mu$ M até 16,5 $\mu$ M, com base em dados da literatura e trabalhos anteriores realizados no laboratório. Os valores obtidos foram lançados no programa estatístico Dr Fit e foi calculado a IC<sub>50</sub> para cada ensaio individualmente. O programa Dr Fit permite a construção e análise de curvas dose-resposta com características multifásicas, permitindo assim o cálculo da concentração de droga que inibe o crescimento celular em 50% (IC<sub>50</sub>). Em seguida, foi feita a média dos valores encontrados. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração da droga afetou proporcionalmente a viabilidade da célula, demonstrando que houve efeito de concentração-resposta em todos os ensaios realizados (Figura 3). A IC<sub>50</sub> obtida para a linhagem foi de 50 $\mu$ M (0,015mg/mL). Este mesmo valor também foi encontrado por Kim e colaboradores (2012) para a linhagem SKOV-3 tratada com cisplatina em ensaio de viabilidade com tempo de 24 horas.

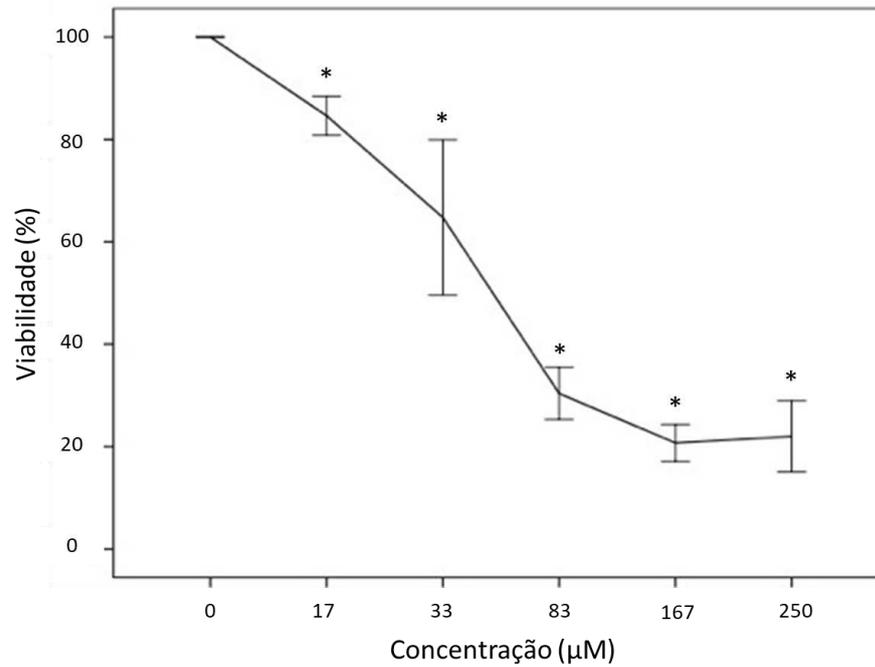


Figura 3: Curva de sobrevivência da linhagem SKOV-3 tratada com cisplatina (n = 3) \*p<0.05

O banco de dados *The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC) ([www.cancerRxgene.org](http://www.cancerRxgene.org)) oferece informações sobre a sensibilidade de linhagens celulares tumorais aos medicamentos. Para a droga cisplatina, concentrações acima de 10µM indicam linhagens que são resistentes a este quimioterápico, corroborando com o dado encontrado neste trabalho. Além disso, o banco de dados apresenta uma IC<sub>50</sub> de 56µM para a linhagem SKOV-3 tratada com cisplatina, sendo este valor próximo ao encontrado em nossos ensaios (Figura 4).

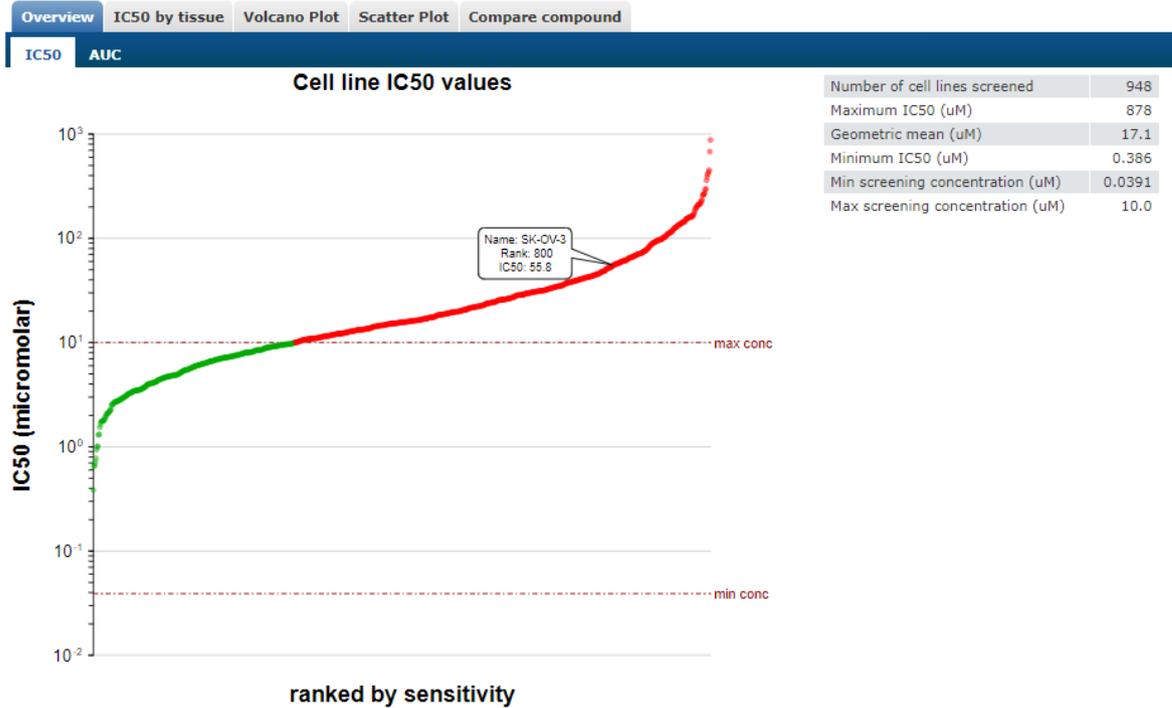


Figura 4: Relação da resistência e sensibilidade à cisplatina em linhagens celulares. As células que apresentam uma  $IC_{50}$  maior que  $10\mu M$  classificadas quimiorresistentes estão plotadas no traço vermelho representado no gráfico. As linhagens quimiossensíveis estão plotadas no traço verde do gráfico. A linhagem SKOV-3 destacada no gráfico apresenta  $IC_{50}$  de  $56\mu M$ . Fonte: *The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC) ([www.cancerRxgene.org](http://www.cancerRxgene.org))

Para determinação da viabilidade na presença de rhTRAIL, foram testadas primeiramente as concentrações de  $600\text{ng/mL}$  até  $100\text{ng/mL}$ . Não foi observado um efeito de concentração-resposta, pois na menor concentração de  $100\text{ng/mL}$  foi observada uma viabilidade celular de 80% e na maior concentração de  $600\text{ng/mL}$  a viabilidade se manteve em 100%. Outro ensaio foi realizado, aumentando as concentrações para  $800\text{ng/mL}$  até  $1400\text{ng/mL}$ . Neste ensaio, foi observado que a viabilidade celular ficou em torno de 80-90% para todas as concentrações testadas (Figura 5). De acordo com o ATCC, a linhagem SKOV-3 também é resistente ao Fator de Necrose Tumoral (TNF), sendo rhTRAIL um integrante dessa família de citocinas.

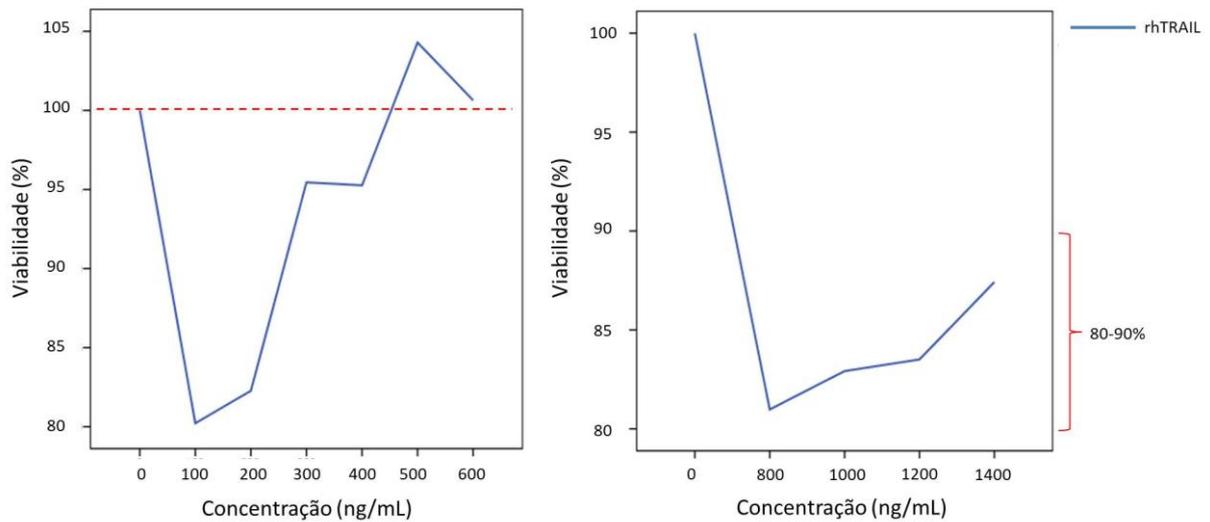


Figura 5: Curvas de concentração-resposta da linhagem SKOV-3 após tratamento com rhTRAIL.

Liu e colaboradores (2006) demonstraram por ensaio de MTT que a concentração de aproximadamente 5000ng/mL seria necessária para se alcançar a  $IC_{50}$  para a linhagem SKOV-3 tratada com rhTRAIL. Não há ensaios realizados com rhTRAIL no banco de dados GDSC. Estudos clínicos de fase I, II e III já foram realizados com TRAIL solúvel recombinante, e apesar da tolerabilidade do composto, foi observada uma pequena redução na sobrevida livre de progressão, e nenhuma melhora na taxa de sobrevida (WAJANT, 2019). O tempo de meia vida de TRAIL solúvel recombinante é de 30-60 minutos em humanos, além disso, esta proteína pode se ligar nos receptores de morte (DR4 e DR5) bem como nos receptores defectivos (DcR1 e DcR2), e estas características estariam ligadas a falha terapêutica dessa droga (WIEZOREK; HOLLAND; GRAVES, 2010). Assim sendo, anticorpos que interagem com os receptores de morte foram desenvolvidos, mas apesar da especificidade e do tempo de meia vida maior (6 a 21 dias), estes também não atingiram um efeito terapêutico promissor em ensaios clínicos controlados randomizados, além disso, a ativação desses receptores aumentaram a proliferação e potencial metastático de células tumorais (GREER *et al.*, 2019; LEGLER *et al.*, 2018). Os anticorpos que interagem com os receptores de morte TRAIL se ligam com alta afinidade a dois receptores, este complexo é inativo e dependem da presença de células que expressam receptores para a imunoglobulina G (FcγR) para a formação de estruturas hexaméricas e ativação de caspase-8, sendo que só a presença do anticorpo não é suficiente para desencadear a morte nas células tumorais (WAJANT, 2019). Os anticorpos com atividade agonista podem interagir com receptores na superfície de uma célula tumoral e ativá-lo, levando a morte celular. Já os receptores com atividade antagonista também se ligam aos receptores, mas impedem a dimerização, atividade quinase e a transdução de sinais, reduzindo assim a proliferação e impedindo o avanço da tumorigênese (BAYER, 2019).

As concentrações de cisplatina testadas se mantiveram entre 250 $\mu$ M até 17 $\mu$ M, e as concentrações de rhTRAIL foram de 100ng/mL até 10ng/mL. O ensaio foi realizado em duplicata, e como duas concentrações foram testadas juntas, não foi possível determinar a IC<sub>50</sub> pelo programa Dr Fit, e sim utilizar as concentrações que se aproximassem em diminuir a viabilidade celular próximo a 50%. No primeiro ensaio, as concentrações de 83 $\mu$ M de cisplatina e 50ng/mL de rhTRAIL inibiram a viabilidade celular em 45%, já no segundo ensaio as mesmas concentrações inibiram a viabilidade celular em 50% (Figura 6). A fim de demonstrar o sinergismo entre ambas as drogas, outro ensaio de viabilidade celular foi feito, onde se manteve fixa a concentração de cisplatina em 83 $\mu$ M, variando as concentrações de rhTRAIL entre 100ng/mL até 10ng/mL. Neste ensaio foi possível observar um perfil de dose-resposta à medida que a concentração de rhTRAIL era aumentada (Figura 7).

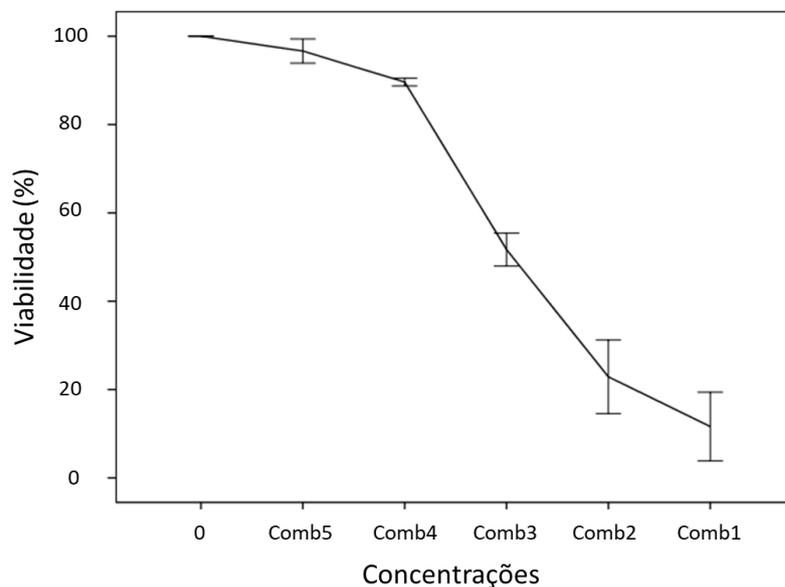


Figura 6: Curva de sobrevivência da linhagem SKOV-3 após tratamento com a combinação de cisplatina e rhTRAIL (n = 2). Combinações das drogas cisplatina ( $\mu$ M) e rhTRAIL (ng/mL): Comb1. 250/100; Comb2. 167/75; Comb3. 83/50; Comb4. 33/25; Comb5. 17/10.

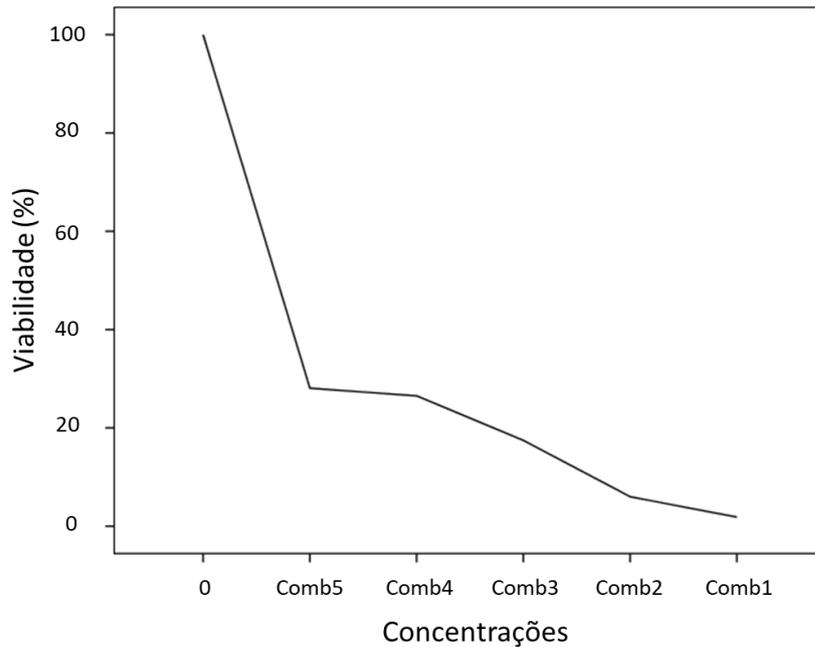


Figura 7: Curva de sobrevivência da linhagem SKOV-3 tratada com a concentração fixa de cisplatina e concentrações variáveis de rhTRAIL. Concentração fixa de cisplatina de  $83\mu\text{M}$  e variação nas concentrações de rhTRAIL (ng/mL): Comb1. 83/100; Comb2. 83/75; Comb3. 83/50; Comb4. 83/25; Comb5. 83/10.

Levando em consideração o resultado dos três ensaios, optou-se por tratar as células com a concentração de  $83\mu\text{M}$  ( $0,025\text{mg/mL}$ ) de cisplatina e  $100\text{ng/mL}$  de rhTRAIL para avaliar o efeito de ambas as drogas nas células SKOV-3 em comparação da ação da cisplatina e rhTRAIL sozinhos. Cuello e colaboradores (2001) testaram o sinergismo entre cisplatina e TRAIL em 11 linhagens tumorais de ovário e obtiveram uma inibição do crescimento celular entre 50 e 60% na linhagem SKOV-3 quando tratada com  $50\mu\text{M}$  de cisplatina e  $100\text{ng/mL}$  de TRAIL, resultado próximo ao encontrado neste trabalho. Além disso, outros estudos tem demonstrado o sinergismo entre esses compostos. Li e colaboradores (2011) transfectaram o gene que codifica TRAIL na linhagem tumoral de ovário A2780 descrita como resistente a cisplatina. A morte celular foi quantificada por citometria de fluxo pela marcação de anexina V. Nas células controle e com vetores vazios, a morte celular foi de 1,26% e 1,35% respectivamente. Nas células transfectadas com TRAIL, a morte celular foi de 16,35%, e após o tratamento com cisplatina, essa porcentagem subiu para 45,69%, reforçando o sinergismo entre esses componentes. Uma hipótese para esse sinergismo foi descrita por Lu e colaboradores (2016) apontando o stress oxidativo e a concentração de cisplatina como causas. Neste trabalho, células SKOV-3 foram pré-tratadas por 1 h com concentração de  $1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$  de cisplatina, e depois expostas a  $500\text{ng/mL}$  de TRAIL por 24h. Nas células tratadas com  $1\mu\text{M}$  de cisplatina, a viabilidade celular foi de 125,11% e o nível de ROS detectado foi

baixo, enquanto que nas células tratadas com 10 $\mu$ M de cisplatina a viabilidade foi reduzida para 37,67% e os níveis de ROS eram 5 vezes maiores do que no ensaio com 1 $\mu$ M.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO, RT-PCR E IMUNOFLUORESCÊNCIA

A caracterização dessa linhagem para os receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3, foi realizada por citometria de fluxo. Interessantemente, a análise mostrou que estes receptores não estão expressos na superfície da membrana celular dessa linhagem (Figura 8). Em seguida, foi realizado PCR *Endpoint* para avaliar a presença dos transcritos dos genes TRAIL-R2 e TRAIL-R3, e verificar se a ausência da proteína poderia estar relacionada com o mecanismo de transcrição desses mRNAs. Observou-se a presença do mRNA para os alvos TRAIL-R2 e TRAIL-R3 (Figura 9).

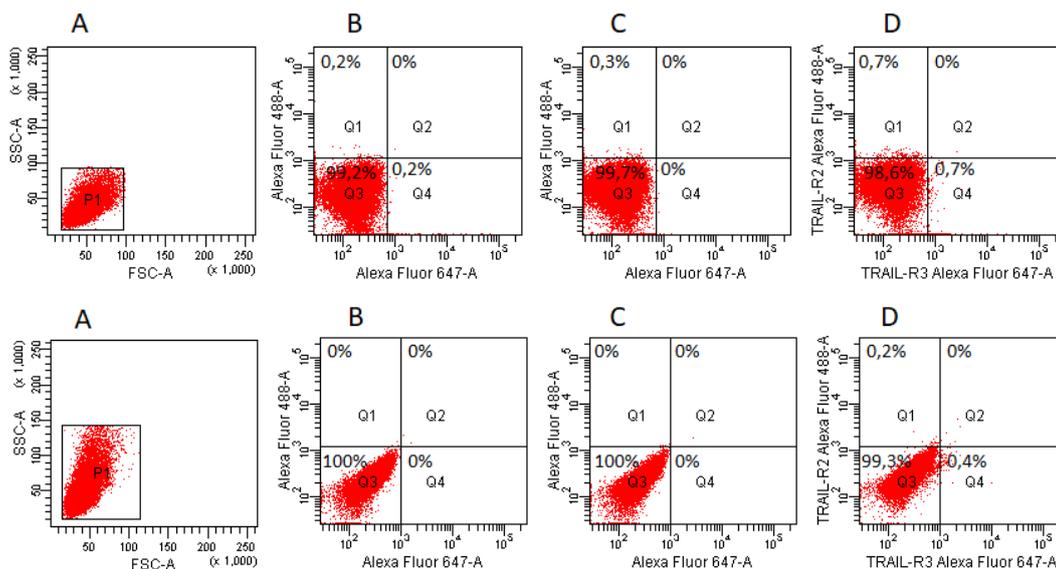


Figura 8: Análise dos receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3 na linhagem SKOV-3 por citometria de fluxo (n = 2). (a) População celular separada por tamanho e granulosidade. (b) *Dot plot* da população celular não marcada. (c) *Dot plot* do controle isotópico. (d) *Dot plot* da dupla marcação dos anticorpos anti-TRAIL-R2 e anti-TRAIL-R3.

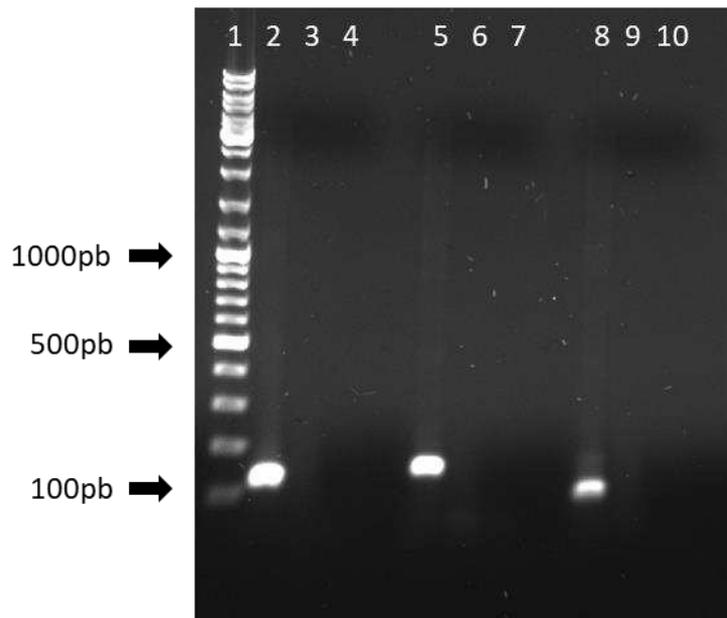


Figura 9: Amplificação de produtos por PCR com iniciadores específicos. 1. Marcador de peso molecular; 2. Amplicon de cDNA de SKOV-3 (TRAIL-R2/128pb); 3. Controle negativo (NORT/TRAIL-R2); 4. Controle negativo (NTC/TRAIL-R2); 5. Amplicon de cDNA de SKOV-3 (TRAIL-R3/173pb); 6. Controle negativo (NORT/TRAIL-R3); 7. Controle negativo (NTC/TRAIL-R3); 8. Amplicon de cDNA de SKOV-3 (TPB/132pb); 9. Controle negativo (NORT/TBP); 10. Controle negativo (NTC/TBP).

A expressão do mRNA dos receptores TRAIL nem sempre refletem a expressão da proteína funcional devido as complexas e variadas modificações pós-translacionais desses receptores. As modificações pós-translacionais dos receptores TRAIL que ocorrem no retículo endoplasmático e complexo de Golgi são necessários para a translocação até a membrana plasmática, além disso, em células tumorais, os receptores podem ficar retidos em autofagossomos, membrana nuclear, núcleo e no *trans-Golgi network*, resultando na deficiência desses receptores na superfície celular (TWOMEY *et al.*, 2015). O gene TRAIL-R2 codifica três transcritos: dois transcritos que codificam proteínas funcionais, e um transcrito que não apresenta um éxon em comparação a variante um, interrompendo a matriz de leitura, tornando este transcrito um candidato a ser degradado pelo sistema *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). É importante ressaltar que os iniciadores utilizados neste trabalho apenas amplificam as sequências das variantes funcionais, e que poderiam ser traduzidas na proteína funcional. O sistema NMD controla a qualidade e quantidade dos transcritos que serão traduzidos a fim de manter a homeostasia celular. No câncer, esse sistema pode ser utilizado pela célula para reduzir a expressão de genes supressores de tumor e adequar esse sistema ao microambiente tumoral (POPP; MAQUAT, 2018).

Kojima e colaboradores (2011) demonstraram que a localização nuclear ou na superfície celular do receptor TRAIL-R2 está relacionado com a disponibilidade da proteína importina  $\beta 1$

nas células HeLa e HepG2. Zhang e colaboradores (2000) descreveram em células de melanoma, que o receptor TRAIL-R3 se encontrava predominantemente localizado no citoplasma da célula, e o receptor TRAIL-R2 se encontrava tanto na superfície celular, como também no *trans-Golgi network*. Sendo assim, também foi realizado ensaio de imunofluorescência para elucidar se estes receptores poderiam estar localizados no interior da célula. No primeiro ensaio de fluorescência as células não foram permeabilizadas (Figura 10), no segundo ensaio as células foram permeabilizadas (Figura 11) a fim de avaliar a presença dos receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3 no interior das células. Em ambos os ensaios não foi detectada a presença destes receptores.

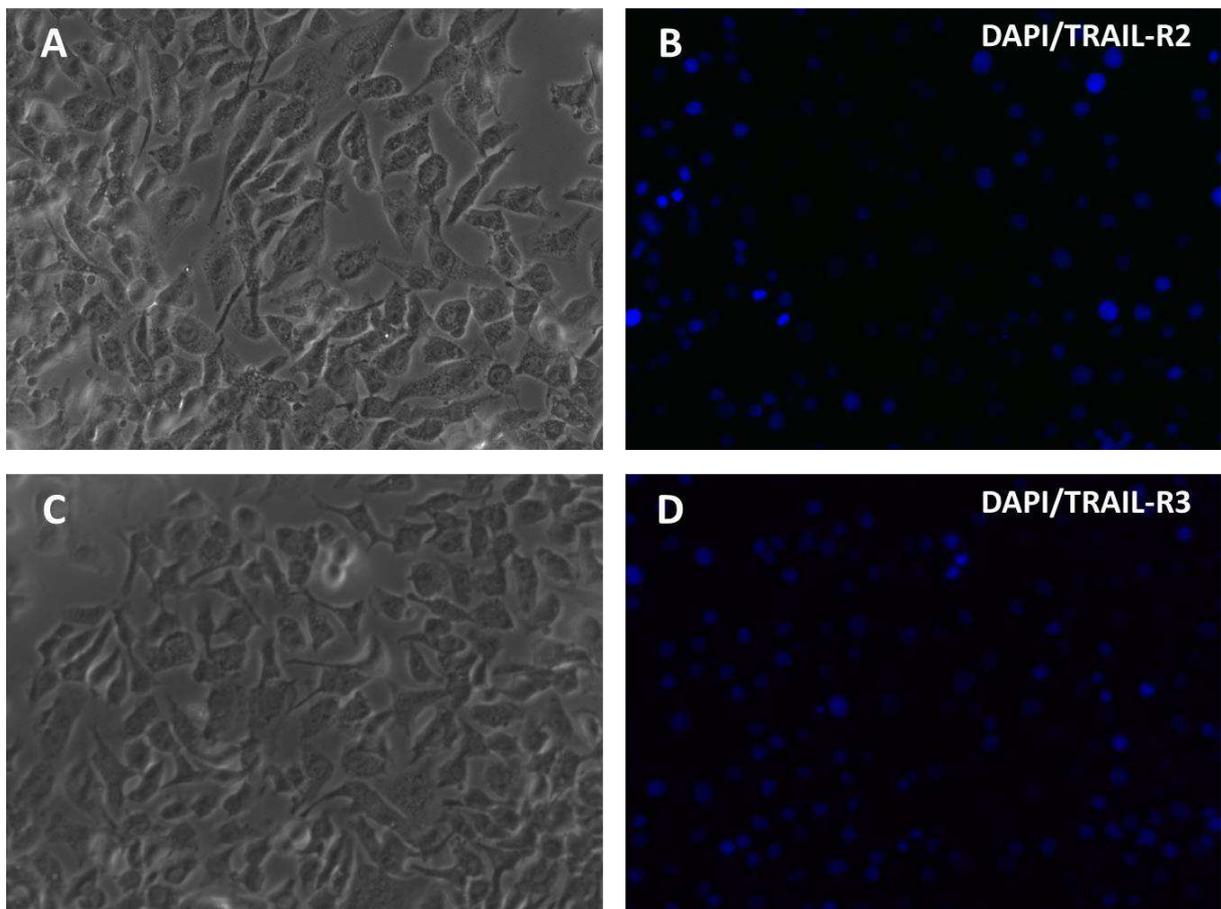


Figura 10: Imunofluorescência das células SKOV-3 impermeabilizadas. Imagens de Contraste de interferência diferencial (DIC) das células SKOV-3 (A,C) e imagens de fluorescência marcadas em azul com DAPI (núcleo) e receptores TRAIL-R2 (B) e TRAIL-R3 (D). (Aumento de 10x).

Juntos, estes resultados indicam que uma regulação pós-transcricional dos receptores TRAIL-R2 e TRAIL-R3 estejam ocorrendo na linhagem SKOV-3, tendo em vista a presença do mRNA e a ausência das proteínas tanto na superfície celular, como no interior da célula. A regulação pós-transcricional é responsável por aproximadamente 60% da variação na expressão de proteínas. As regiões não traduzidas 5' e 3' (UTRs) são domínios do mRNA que controlam o

processo de regulação gênica, pois essas regiões participam do processamento do pré-mRNA, estabilidade do mRNA e início da tradução. Sendo assim, essas regiões podem estar diretamente envolvidas em doenças como o câncer (SCHUSTER; HSIEH, 2019). A interação entre proteínas que se ligam ao RNA (RBPs) é a base da regulação pós-transcricional de um gene. O antígeno humano R (HuR) é uma RBP que se liga preferencialmente aos elementos ricos em adenilato e uridilato (AREs) que se encontram nas UTRs de mRNA alvos. AREs são sinais para a degradação do RNA, e quando HuR se liga a esses sítios pode estabilizar e evitar essa degradação (JONAS; CALIN; PICHLER, 2020; WANG, J. *et al.*, 2013). Entretanto, a proteína HuR também pode se ligar ao RNA e permitir sua degradação (MEISNER; FILIPOWICZ, 2010; OTSUKA *et al.*, 2019). Pineda e colaboradores (2012) demonstraram que a proteína HuR se liga a região 5' UTR do mRNA de TRAIL-R2 de células de adenocarcinoma pancreático ductal. As células silenciadas para HuR exibiam maior expressão proteica de TRAIL-R2. Além disso, o aumento na expressão deste receptor culminava no aumento da taxa de morte após o tratamento com anticorpo anti-TRAIL-R2. Zhang e colaboradores mostraram que a expressão do receptor TRAIL-R2 em células de melanoma era regulada pela ligação de RBPs a região 3' UTR do mRNA de TRAIL-R2, e que o nível de expressão da proteína TRAIL-R2 não estava intimamente associado ao nível de expressão do mRNA.

Os microRNAs pertencem à família dos RNAs não-codificantes que suprimem a expressão gênica a nível pós-transcricional e desempenham um importante papel em várias atividades biológicas como diferenciação, apoptose, proliferação, carcinogênese e quimiorresistência. Estudos mostraram que TRAIL-R2 é um alvo direto do miR-1246 liberado de células tumorais de pulmão irradiadas, e também alvo do miR-133a em glioblastomas (WANG, S. SHAN *et al.*, 2017; YUAN, D. *et al.*, 2016). A regulação pós-transcricional dos receptores TRAIL ainda não foi elucidada em linhagens tumorais de ovário ou tecidos humanos.

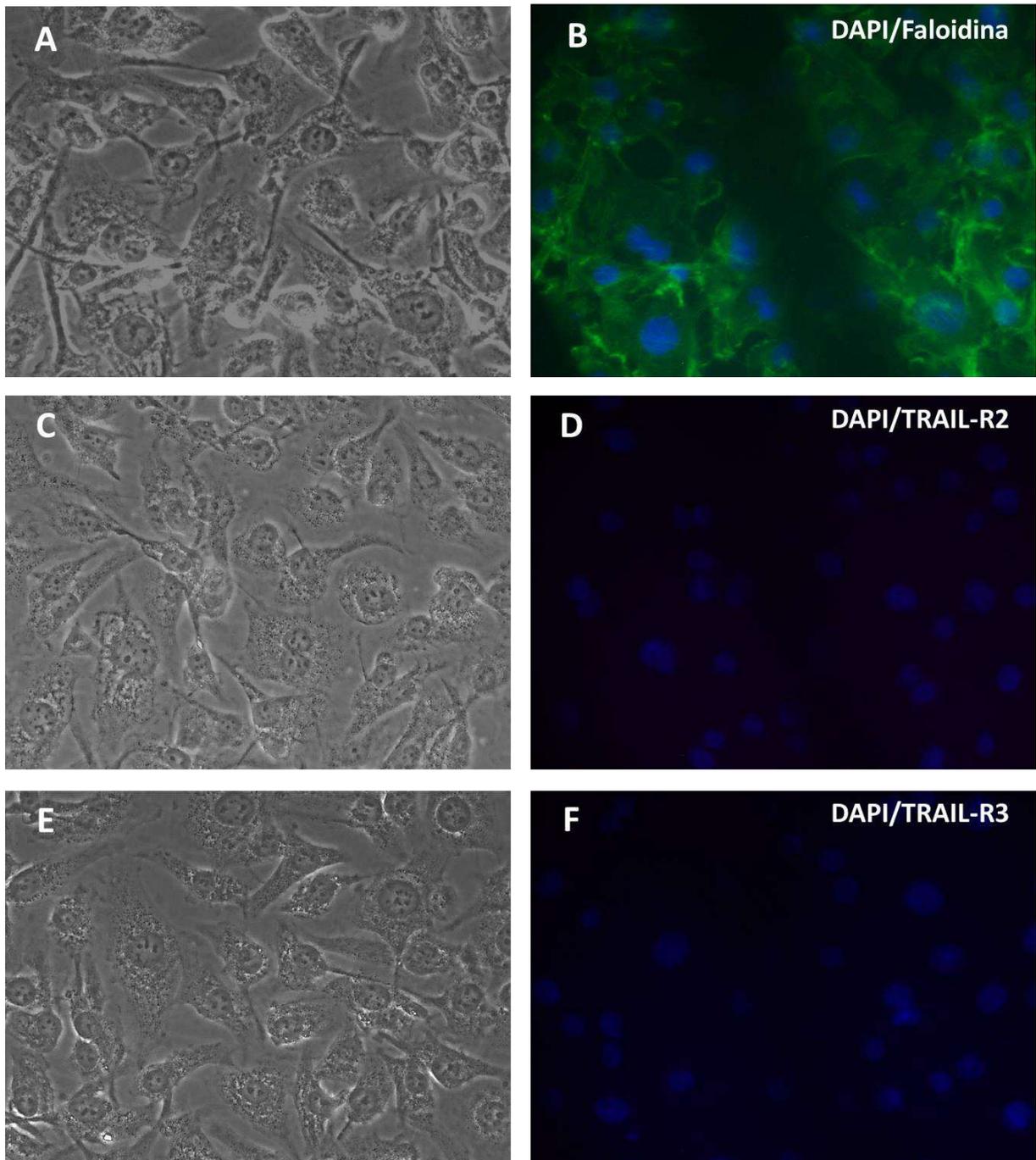


Figura 11: Imunofluorescência das células SKOV-3 permeabilizadas. Imagens de Contraste de interferência diferencial (DIC) das células SKOV-3 (A,C,E) imagens de fluorescência marcadas com DAPI (núcleo em azul) /Faloidina (citoesqueleto em verde) (B) e receptores TRAIL-R2 (D) e TRAIL-R3 (F). (Aumento de 20x).

#### 4.3 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA

A concentração e pureza representada pela razão entre 260/280 mostraram-se satisfatórias para uso das amostras controle e tratadas após a extração do RNA (Tabela 5).

Tabela 5: Quantificação e pureza do RNA total extraído das células SKOV-3 tratadas e controle

Linhagem	Droga	Concentração µg/µL	A260	A280	A260/A280
SKOV-3	Controle	1,021	25,78	12,87	2.024
SKOV-3	Cisplatina	0,586	14,85	7,41	2.032
SKOV-3	Cisplatina/rhTRAIL	0,378	9,78	4,93	2.054
SKOV-3	rhTRAIL	1,112	28.14	13.91	2.049

A integridade dos RNAs foi analisada em gel de agarose 1%, onde se observaram as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal íntegras devido à presença dos dois fragmentos (Figura 12). Após a verificação da integridade do RNA, foi feito o tratamento com DNase e em seguida a síntese do cDNA.

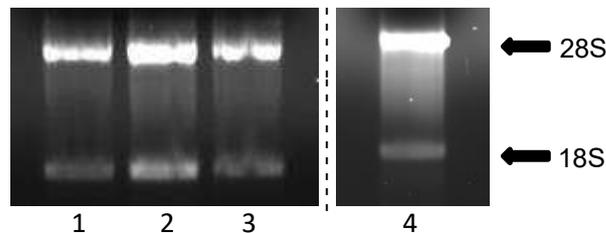


Figura 12: Integridade do RNA extraído das células SKOV-3 controle e tratadas. 1. SKOV-3 controle; 2. SKOV-3 tratada com cisplatina; 3. SKOV-3 tratada com cisplatina e rhTRAIL; 4. SKOV-3 tratada com rhTRAIL. As linhas pontilhadas separam resultados obtidos em ensaios diferentes.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Avaliou-se a expressão dos genes, *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, *TRAIL-R3*, *TRAIL-R4*, *RIPK1*, *MLKL*, *NFKB1*, *RELA*, *TP53*, *CASP8* e *CFLAR* na linhagem celular SKOV-3 após a exposição às drogas cisplatina, rhTRAIL e a combinação destes por meio da técnica de RT-qPCR (Figura 13). No tratamento com cisplatina, o aumento na expressão do alvo *TP53* foi o mais notável. A cisplatina, droga de escolha no tratamento para CO, liga-se ao gDNA ou mitocondrial criando lesões que ativam a resposta a danos no DNA (DDR). Esse mecanismo ativa vias de sinalização envolvidas com p53 que podem levar a apoptose (TANIDA *et al.*, 2012). Também é conhecido que p53 regula a transcrição dos receptores TRAIL (TRAIL-R1-4) e que agentes quimioterápicos potencializam a morte celular em células p53 *wild-type* através do aumento na expressão dos receptores TRAIL-R1 e R2 na membrana plasmática, sensibilizando células resistentes a apoptose induzida por TRAIL (ZHAO; LU; SHEN, 2012). É interessante observar que os genes *TRAIL-R1* e *TRAIL-R2* não apresentaram aumento na expressão, mesmo com a regulação positiva de *TP53*. Watcher e colaboradores (2013) demonstraram que a influência

de p53 na forma *wild-type* ou mutada em induzir a morte via TRAIL depende do tipo celular e pode variar apresentando um papel positivo, negativo ou irrelevante. Além disso, a apoptose induzida por TRAIL independe de p53 (KHAIDER *et al.*, 2012). O aumento de *TP53* pode ser um reflexo do dano causado à célula após a exposição à droga. Também se observa uma diminuição na expressão do gene *CASP8* e um aumento no gene *CFLAR*, que codifica uma proteína homóloga à caspase 8, mas sem atividade proteolítica. Tendo em vista que a quantidade de CFLAR em relação à caspase 8 seja maior, o aumento em *TP53* não seria suficiente para orquestrar a execução da apoptose nessa linhagem, culminando numa linhagem capaz de sobreviver com os danos causados pela droga, provocando quimiorresistência. A proteína p53 codificada pelo gene *TP53* é um regulador transcricional que participa de múltiplos processos celulares. Ao se ligar ao DNA, esta proteína controla a expressão de vários genes alvo que mantêm a homeostase e integridade genômica. A proteína p53 pode ativar o reparo de DNA efetuando a parada do ciclo celular durante a transição G1/S ou iniciar a apoptose quando o dano não é reparado, evitando assim a perpetuação de um DNA com danos (ZHANG, Y. *et al.*, 2016). Células tumorais sem p53 funcional são mais resistentes à cisplatina em relação às células que apresentam essa proteína funcional, tendo em vista que linhagens celulares resistentes à cisplatina voltam a serem sensíveis após a reconstituição com p53 *wild-type*. Além disso, a eficiência quimioterápica de uma droga não depende apenas da sua habilidade em promover dano ao DNA, mas também na habilidade da célula em detectar e responder a esse dano (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010). Vale ressaltar que de acordo com o ATCC, a linhagem SKOV-3 é resistente à cisplatina e apresenta mutação em *TP53* (TATE *et al.*, 2019).

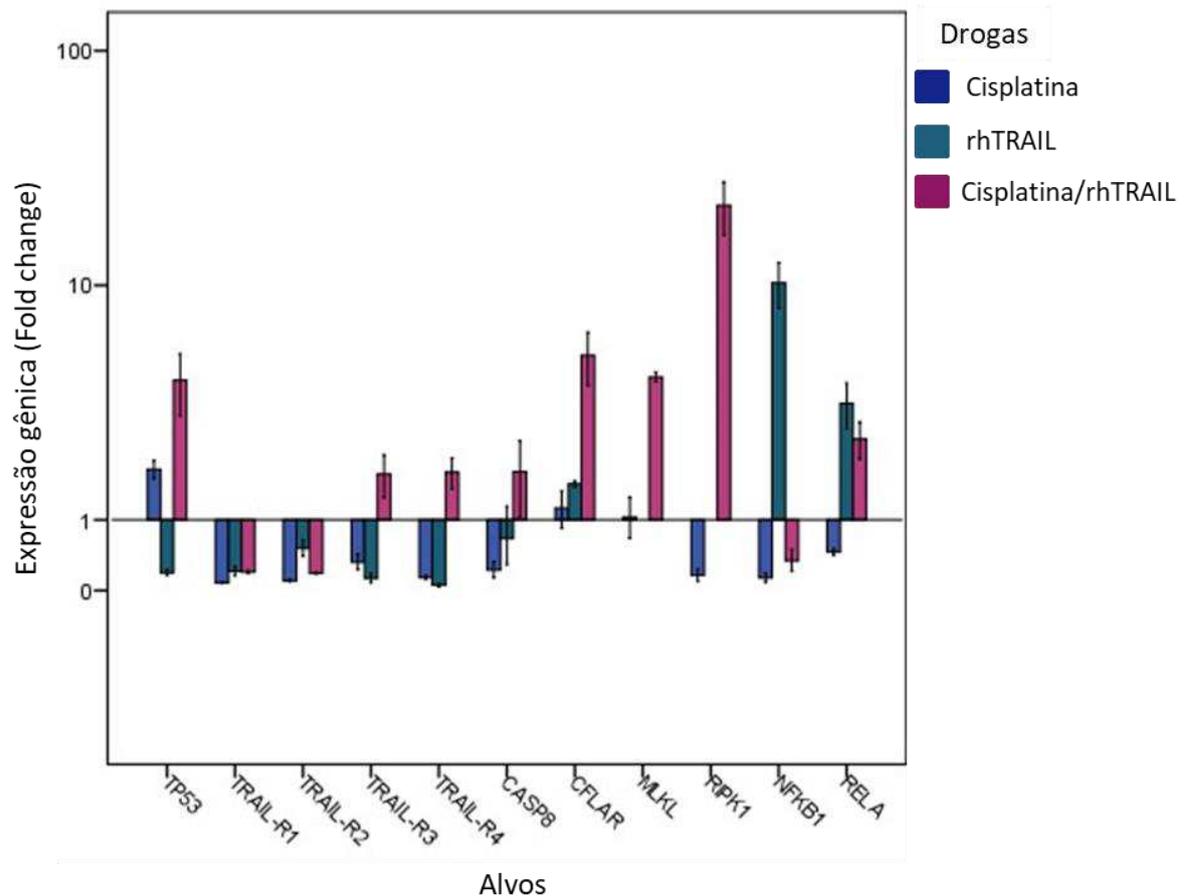


Figura 13: Perfil de expressão gênica da linhagem SKOV-3 após tratamentos (n = 2).

Já no tratamento com cisplatina em combinação com rhTRAIL houve um perfil de expressão diferencial ao encontrado com cisplatina isolado. Apesar da linhagem SKOV-3 ser *TP53* mutado, observou-se um aumento na expressão desse alvo, seguido do aumento da expressão de *TRAIL-R3* e *TRAIL-R4*. O aumento em *TP53* pode ser uma resposta ao dano causado pelo tratamento. O primeiro nível de regulação para conferir sensibilidade a TRAIL é o nível de expressão dos receptores na membrana celular das células. Um déficit nos receptores de morte e um aumento nos receptores defectivos podem impedir que a apoptose seja iniciada (MÉRINO *et al.*, 2006). O receptor TRAIL-R3 não apresenta domínio intracitoplasmático e é ancorado ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) na membrana celular (AMARANTE-MENDES; GRIFFITH, 2015). Já o receptor TRAIL-R4 pertence à classe de receptores que apresentam um domínio intracitoplasmático truncado, mas que podem conter motivos interativos para TRAF na sua região intracelular defectiva e dependendo da ligação de proteínas adaptadoras são capazes de mediar um complexo de sinalização e ativar outras vias (XIE, 2013). Narayan e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com rhTRAIL sozinho ou combinado com cisplatina em linhagens de câncer cervical que apresentavam uma menor expressão de TRAIL-R4 em relação às linhagem que

apresentavam níveis normais, exibiram maior índice de apoptose e menor viabilidade celular, e que a apoptose mediada por rhTRAIL depende do balanço de expressão entre os receptores de morte (TRAIL-R1 e TRAIL-R2) e os defectivos (TRAIL-R3 e TRAIL-R4). Estudos *in vitro* utilizando seis linhagens celulares de leucemia mieloide confirmaram a sensibilidade dessas células frente ao tratamento com TRAIL quando estas expressavam TRAIL-R1 e TRAIL-R2. Além disso, o tratamento das células com PI-PLC (fosfoinositida fosfolipase C), um inibidor de GPI, conferia maior sensibilidade a TRAIL (CHAMULEAU *et al.*, 2011). A expressão de receptores defectivos associados a tumores de ovário metastáticos já foi relatada anteriormente por nosso grupo de estudo. Braga e colaboradores (2012) demonstraram em amostras clínicas de CO, que a expressão de *TRAIL-R3* foi maior em tumores metastáticos em relação a tumores primários, atribuindo este fato às altas taxa de proliferação e resistência a apoptose encontrado em metástases, demonstrando a relação destes receptores defectivos com a agressividade da doença e a resistência ao tratamento. Além disso, sabe-se que o microambiente tumoral é composto por várias células mieloides, linfoides, fibroblastos e células endoteliais que se comunicam com as células tumorais via interações diretas ou sinais bioquímicos. A expressão de TRAIL e dos TRAIL-R é regulada por vários fatores que dependem do contexto celular. Após ativação, as células NK medeiam à morte celular através da liberação de enzimas (perforina e granzima), ou via contato direto célula-célula através da ativação da via TRAIL (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018; PITT *et al.*, 2016). Sendo assim, o aumento na regulação da transcrição de um gene que codifica um receptor defectivo do sistema TRAIL após o tratamento com cisplatina, estaria propiciando a evasão a apoptose das células tumorais frente ao sistema imune da paciente, pois quando as células NK se ligassem ao receptor defectivo a apoptose não seria desencadeada, e quando se ligasse ao receptor truncado, poderia ativar vias de sobrevivência, proliferação e inflamação, podendo este ser um mecanismo de quimiorresistência. O'Leary e colaboradores (2016) demonstraram em ensaios de co-cultura entre células tumorais de cólon (Colo205) e fibroblastos dérmicos humanos (representando uma população do estroma) que células estromais que expressam em sua superfície o receptor defectivo TRAIL-R3 são capazes de inibir a atividade de TRAIL em até 80%, além disso, os fibroblastos desse ensaio foram tratados por 48h com TNF- $\gamma$ , e foi observado um aumento considerável na expressão de TRAIL-R3 na membrana dessas células, apontando para a possibilidade de que um microambiente inflamatório induz a expressão de receptores defectivos levando a resistência tumoral a TRAIL. Inferindo que o aumento na regulação de *TRAIL-R3* e *TRAIL-R4* após o tratamento com cisplatina e rhTRAIL será refletido na produção da proteína, pode-se dizer que este seria um mecanismo de resistência desenvolvido pela célula em evadir a apoptose pela via TRAIL controlado pelo sistema imune da paciente. É importante ressaltar que drogas derivadas da cisplatina ainda

são utilizadas como linha principal de tratamento no CO, apesar dos mecanismos de resistência adquiridos pelos tumores (ALDOSSARY, 2019).

Interessantemente, o gene com maior expressão após o tratamento das células com cisplatina e rhTRAIL combinados foi *RIPK1*. *RIPK1* é capaz de ativar NF-κB, apoptose e necroptose. O aumento na expressão de *TRAIL-R4* e *RELA* pode ser um indício de que a via de NF-κB esteja sendo ativada através de TRAIL-R4. Mesmo com a diminuição do gene *NFKB1*, a proteína codificada por *RELA* é capaz de formar homodímeros e ativar a via de NF-κB. A família de NF-κB de fatores de transcrição consiste em cinco membros, NFKB1/p50, NFKB2/p52, RELA/p65, REL/c-Rel e RELB/RelB, os quais dividem um domínio homólogo Rel na extremidade N-terminal (RHD), responsável pela ligação ao DNA a partir da homo ou heterodimerização (GRAHAM; GIBSON, 2005). O domínio de ativação transcricional (TAD), necessário para regulação positiva da expressão de outros genes, está presente apenas em RELA, REL e RELB. NFKB1 e NFKB2 reprimem a transcrição, a menos que formem heterodímeros com p65, c-Rel e RelB, ou se associem a outras proteínas com atividade transcricional (HAYDEN; GHOSH, 2008). Estes fatores de transcrição se ligam a regiões κB que estão distribuídos por vários genes alvos. Com isso, em uma única célula pode existir diversas combinações diméricas entre estas proteínas. Esta combinação seria responsável pelos efeitos opostos de NF-κB em tipos celulares diferentes (DORRINGTON; FRASER, 2019). Neste contexto, *RIPK1* pode desempenhar um papel ligado à sobrevivência celular, progressão tumoral e inflamação, dependendo dos alvos que p65 irá regular. Já o aumento de *RIPK1* seguida pelo aumento de *CASP8* pode sugerir que a célula esteja morrendo por apoptose. Um complexo de sinalização para apoptose pode ser formado por *RIPK1*, TRADD, caspase-8 e FADD, conhecido também como ripoptossomo, pois caspase-8 inativa *RIPK1* através de clivagem proteolítica e a ativação das caspases são iniciadas. Li e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com APG-1387 (inibidor da família IAP – proteínas inibidoras da apoptose) nas células SKOV-3 induzia a formação de um complexo consistindo nas proteínas *RIPK1*, FADD e caspase-8 levando a apoptose. É importante ressaltar como *RIPK1* pode desenvolver um papel duplo no CO, e este mecanismo foi elucidado por Zheng e colaboradores (2020) utilizando a linhagem SKOV-3. Após o *knockout* (KO) de *RIPK1* nas células, a proliferação celular foi diminuída, devido à parada do ciclo celular nas fases G2/M. Além disso, células KO para *RIPK1* apresentavam menor sensibilidade à cisplatina, em relação às células *wild-type*, e este mecanismo estaria ligado à produção de ROS dependente de *RIPK1*. O aumento na expressão de *RIPK1* também é acompanhado pelo aumento em *CFLAR*. O gene *CFLAR* é responsável por codificar a proteína c-FLIP, um homólogo de caspase-8 sem atividade catalítica. c-FLIP pode se ligar a FADD ou caspase-8 e inibir a formação de DISC. O aumento desta proteína tem sido descrito como um dos maiores fatores

de resistência que as células desenvolvem para evadir à apoptose via TRAIL e quimioterápicos (SAFA; POLLOK, 2011). Alguns estudos demonstram que o silenciamento de *CFLAR* reverte a resistência a apoptose via TRAIL (EL-GAZZAR *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011). O aumento na expressão de *CFLAR* é acompanhado pelo aumento de *RELA*, e *CFLAR* é regulado pelos fatores de transcrição de NF- $\kappa$ B (HUMPHREYS; ESPONA-FIEDLER; LONGLEY, 2018). O gene *CFLAR* está mais expresso que *CASP8* e se esta expressão for refletida na produção de proteínas desses dois alvos, pode-se inferir que c-FLIP estaria inibindo a apoptose e favorecendo a morte celular por necroptose, já que o gene *MLKL* que codifica a proteína final da cascata de necroptose também mostra um aumento em sua expressão. Hernandez e colaboradores (2015) silenciaram caspase-8 nas células tumorais de ovário Ovar3 e Caov3 e em seguida trataram com Birinapant (inibidor de IAP). Foi observado um aumento das proteínas RIPK1 e MLKL, demonstrando que na ausência de caspase-8, a morte celular pode ser desencadeada via necroptose. A necroptose é um tipo de morte celular programada mediada por receptores, porém apresenta características de necrose como inchaço celular seguido pela ruptura da membrana plasmática e ocorre na ausência de caspase-8. A necroptose é considerada uma morte celular inflamatória devido à liberação de DAMPS (Padões Moleculares Associados a Danos), e a liberação dessas substâncias são responsáveis pelo duplo papel que a necroptose exerce no processo de tumorigênese. A liberação dos DAMPS pelas células necroptóticas pode fornecer antígenos as células dendríticas ativando linfócitos T CD8+ através da apresentação cruzada, resultando na eliminação das células tumorais, contribuindo assim para a imunidade anti-tumoral. Entretanto, esses mesmos DAMPS também podem recrutar células inflamatórias, promovendo inflamação no micro ambiente tumoral, favorecendo a progressão tumoral através da proliferação celular e metástase. A inflamação induzida pelos DAMPs na necroptose é capaz de ativar a via de sinalização de NF- $\kappa$ B, sendo assim, o aumento na expressão do gene *RELA* pode ser uma resposta à necroptose que pode estar ocorrendo nessas células após o tratamento de cisplatina e rhTRAIL em combinação. Huang e colaboradores (2016) testaram o inibidor de proteassomo YSY01A nas células SKOV-3, e observaram que a diminuição na expressão proteica de p65 e STAT3 era dose dependente, além disso, quando as células eram tratadas com cisplatina e YSY01A em combinação, a sensibilidade à cisplatina era maior. O inibidor de proteassomo estaria causando um stress no retículo endoplasmático e impedindo a síntese de novo dessas proteínas. Este estudo infere a relação entre resistência e p65 na linhagem SKOV-3. Giopanou e colaboradores (2014) analisaram por imunohistoquímica a expressão de p65 em amostras de ovário normal e carcinoma de ovário. As amostras de ovário normal apresentaram uma expressão negativa, enquanto que nas amostras de carcinoma de ovário foi observada uma alta expressão, sugerindo que pode existir uma forte correlação entre a progressão tumoral e p65 na

carcinogênese ovariana. Por fim, no tratamento com rhTRAIL destacou-se o aumento da expressão de *NFKB1* e *RELA*. Apesar da expressão dos receptores TRAIL que ativam a via de NF-kB não acompanharem esse aumento na expressão, este resultado sugere que o tratamento com rhTRAIL tem uma tendência de ativar a progressão tumoral nesta linhagem celular.

#### 4.4 SILENCIAMENTO CELULAR DE TRAIL-R2

O receptor TRAIL-R2 apresenta funcionalidade mais diversa entre os receptores TRAIL: sinalização para apoptose, sinalização para via de proliferação, inflamação, migração, maturação de miRNAs, além dos diversos mecanismos que a célula desenvolve para diminuir a expressão deste na superfície da membrana celular. O silenciamento gênico leva a redução na expressão de uma proteína alvo, e é uma importante ferramenta que permite estudar e elucidar a função de um gene num estado normal ou de doença da célula (ZIMMER *et al.*, 2019). Seguindo os estudos já desenvolvidos no laboratório sobre este receptor, e tendo como ponto de partida os ensaios de expressão gênica onde se detectava a presença do mRNA, o kit de silenciamento foi adquirido a fim descrever o papel deste receptor na carcinogênese ovariana. Entretanto, os achados imunofenotípicos mostraram, que uma regulação pós-transcricional está ocorrendo nessa linhagem e impedindo a expressão da proteína. Apesar disso, no ensaio de silenciamento com tempo de 72h foi possível obter um silenciamento do mRNA de TRAIL-R2 de 88,3% (Figura 14). Foi utilizada a fórmula  $(1-\Delta\Delta Cq) \times 100$  para calcular a porcentagem de silenciamento, e a normalização dos valores foi feita com as células controle que não sofreram transfecção e o gene endógeno *GAPDH*. Na figura 15 uma parte do mRNA de TRAIL-R2 está demonstrado e em destaque a sequência que um dos siRNA irá reconhecer por complementariedade de bases para promover a degradação desse mRNA. O ensaio mostrou redução de mRNA para TRAIL-R2, mas nossos estudos mostraram simultaneamente a ausência da proteína na membrana, citoplasma e núcleo. Então, ensaios sobre o comportamento da célula silenciada deixaram de fazer sentido por ela já ser silenciada para este gene ou por apresentar regulação pós-transcricional que impedem a tradução da proteína TRAIL-R2. Logo os nossos resultados já mostram como uma célula sem TRAIL-R2 responde ao tratamento quimioterápico ou por rhTRAIL.

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa (ainda não publicados) mostraram que a linhagem SKOV-3 é refratária ao tratamento com paclitaxel, outro quimioterápico usado no tratamento do CO, e que após a exposição à droga, há o enriquecimento de subpopulações de células tronco do câncer (CSC's). Quando tratada com cisplatina, houve crescimento de outra subpopulação celular ainda não descrita pela literatura. Logo, o comportamento dessa linhagem mostra a capacidade de evasão a apoptose, confirmada pelo crescimento dessas

células em modelo xenográfico da CAM *ex-vivo* (dados do grupo). Apesar dos ensaios posteriores ao silenciamento não terem sido realizados, a otimização deste ensaio possibilita o seu uso para estudos futuros sobre este receptor.

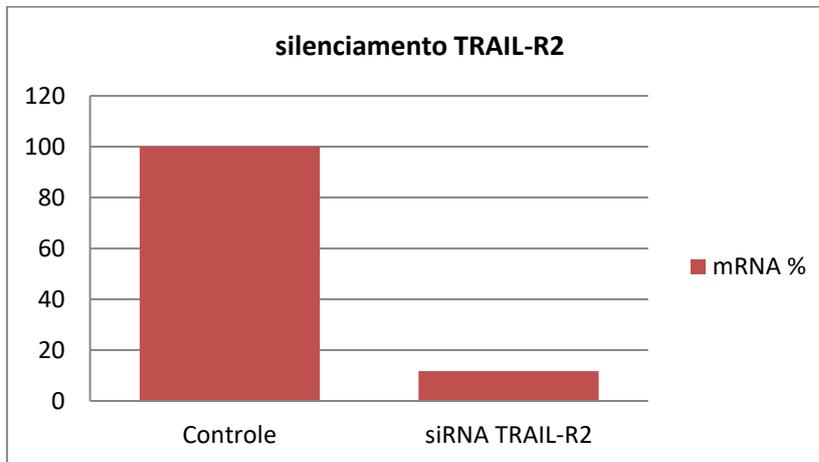


Figura 14: Porcentagem de silenciamento de TRAIL-R2 obtido na linhagem SKOV-3

```
>NM_003842.5 Homo sapiens TNF receptor superfamily member 10b
(TNFRSF10B), transcript variant 1, mRNA

1081 CAGAAGCTGA AAGGTCTCAG AGGAGGAGGC TGCTGGTTCC AGCAAATGAA GGTGATCCCA
1141 CTGAGACTCT GAGACAGTGC TTCGATGACT TTGCAGACTT GGTGCCCTTT GACTCCTGGG
1201 AGCCGCTCAT GAGGAAGTTG GGCCTCATGG ACAATGAGAT AAAGGTGGCT AAAGCTGAGG
1261 CAGCGGGCCA CAGGGACACC TTGTACACGA TGCTGATAAA GTGGGTCAAC AAAACCGGGC
      sense siRNA          5' CUGAUAAA GUGGGUCAAC ATT3'
      antisense siRNA      3' ACGACUAUUU CACCCAGUUG U5'
```

Figura 15: Alinhamento da sequência do siRNA com o mRNA de TRAIL-R2.

## 5. CONCLUSÕES

O tratamento do câncer de ovário tem se mantido sem grandes avanços nas últimas quatro décadas. Apesar da boa resposta inicial ao tratamento com cisplatina, grande parte das pacientes apresenta recidiva associada à quimiorresistência, culminando na baixa taxa de sobrevida. A descoberta do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) como um promissor agente terapêutico no câncer não apresentou resultados significativos nos estudos clínicos. Entretanto, a falta de conhecimento do mecanismo do sistema TRAIL/TRAIL-R pode ser a principal causa na falha terapêutica. Resumir a funcionalidade do sistema TRAIL/TRAIL-R a apenas dois receptores defectivos e dois receptores de morte têm se provado ineficiente ao tratamento da carcinogênese. Isto por que os receptores de morte TRAIL-R1/R2 podem desencadear apoptose nas células, mas, além disso, também regulam vias associadas à proliferação, inflamação e migração, dependendo do status de caspase 8 na célula. O receptor defectivo TRAIL-R3 não é capaz de transduzir nenhum sinal à célula, mas pode “sequestrar” TRAIL para que não se ligue aos receptores de morte. Em contrapartida, o receptor defectivo TRAIL-R4 apresenta um domínio truncado que permite o recrutamento de proteínas que ativam uma via de sobrevivência, e que também sinalizam para outro tipo de morte celular programada: a necroptose. Esta diversidade de possibilidades que os receptores TRAIL possuem pôde ser visualizada nos ensaios de expressão gênica, pois cada tratamento resultou em uma regulação transcricional diferente. Nos três tratamentos aplicados, um perfil anti-apoptótico foi visto. A cisplatina segue sendo o quimioterápico padrão de primeira linha no tratamento para o câncer de ovário, e apesar da sua capacidade de promover apoptose, várias células irão adquirir resistência pela habilidade de evadir a apoptose e assim propagar danos. Em nossos estudos, apesar do aumento em *TP53*, este não foi capaz de regular positivamente os receptores de morte, e também não foi observado o aumento em *CASP8*. No tratamento com rhTRAIL, o aumento em *NFKB1* e *RELA* evidenciou que a célula apresenta um perfil voltado para a progressão tumoral, e mesmo na presença do ligante, nenhum dos receptores de morte teve aumento em sua expressão. Por fim, no tratamento com cisplatina e rhTRAIL combinados, os alvos com aumento em sua expressão também apresentaram uma maior tendência em ativar mecanismos de sobrevivência. Além disso, o mecanismo de morte ativado frente a este tratamento tem maior tendência para necroptose em relação a apoptose. Estes mecanismos de regulação observados podem culminar na falha terapêutica. A linhagem celular SKOV-3 é descrita como metastática, e esta pode ser uma explicação para os resultados encontrados neste trabalho. Sendo assim, este trabalho reforça que o conhecimento da biologia do tumor se mostra de extrema importância para a melhoria no prognóstico e sobrevida das pacientes, tendo em vista que o tratamento padrão é aplicado de

forma indiscriminada. Enquanto os protocolos de tratamento permanecem fixos e inalterados, a biologia do câncer é um sistema altamente dinâmico.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALDOSSARY, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 12, n. 1, p. 7–15, 2019.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GRIFFITH, T. S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 155, p. 117–131, 2015.
- BASU, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2010, 2010.
- BAYER, V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 35, n. 5, p. 150927, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.006>>.
- BERTSCH, U. *et al.* Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: Emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death and Disease*, v. 5, n. 8, p. 1–10, 2014.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BROUHARD, G. J.; RICE, L. M. Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 7, p. 451–463, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0009-y>>.
- CHAMANI, M. *et al.* Chitosan is a potential inhibitor of ovarian cancer: Molecular aspects. *IUBMB Life*, v. 72, n. 4, p. 687–697, 2020.
- CHAMULEAU, M. E. D. *et al.* High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2. *Leukemia Research*, v. 35, n. 6, p. 741–749, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.12.032>>.
- CUELLO, M. *et al.* Synergistic induction of apoptosis by the combination of TRAIL and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, v. 81, n. 3, p. 380–390, 2001.
- CUNNEA, P.; STRONACH, E. A. Modeling platinum sensitive and resistant high-grade serous ovarian cancer: Development and applications of experimental systems. *Frontiers in Oncology*, v. 4 APR, n. April, p. 1–8, 2014.
- DAMIA, G.; BROGGINI, M. Platinum resistance in ovarian cancer: Role of DNA repair. *Cancers*, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2019.
- DAVIS, A.; TINKER, A. V.; FRIEDLANDER, M. “platinum resistant” ovarian cancer: What is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecologic Oncology*, v. 133, n. 3, p. 624–631, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.02.038>>.
- DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M.; GENESTIE, C. Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chinese Journal of Cancer*, v. 34, n. 1, p. 50–55, 2015.
- DEY, A.; TERGAONKAR, V.; LANE, D. P. Double-edged swords as cancer therapeutics: Simultaneously targeting p53 and NF- $\kappa$ B pathways. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 12, p. 1031–1040, 2008.
- DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death.

*Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2018.

DI VEROLI, G. Y. *et al.* An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Scientific Reports*, v. 5, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep14701>>.

DING, L. *et al.* Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-flip. *Cancer Investigation*, v. 29, n. 8, p. 511–520, 2011.

DIRETRIZES DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS DE NEOPLASIA MALIGNA EPITELIAL DE OVÁRIO/2019. Disponível em [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2019/Relatorio\\_DDT\\_NeoplasiaMalignaEpitelialdeOvario\\_2019.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2019/Relatorio_DDT_NeoplasiaMalignaEpitelialdeOvario_2019.pdf). Acesso em: Abril/2020.

DORRINGTON, M. G.; FRASER, I. D. C. NF- $\kappa$ B signaling in macrophages: Dynamics, crosstalk, and signal integration. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. APR, 2019.

DOUBENI, C. A, DOUBENI, A. R, MYERS, A. E. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*. 2016;93(11):937-944.

EL-GAZZAR, A. *et al.* The role of c-FLIPL in ovarian cancer: Chaperoning tumor cells from immunosurveillance and increasing their invasive potential. *Gynecologic Oncology*, v. 117, n. 3, p. 451–459, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.02.024>>.

ELROD, H. A.; SUN, S. Y. Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer Biology and Therapy*, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2008.

FALSCHLEHNER, C. *et al.* TRAIL signalling: Decisions between life and death. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 39, n. 7–8, p. 1462–1475, 2007.

FALSCHLEHNER, C.; SCHAEFER, U.; WALCZAK, H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*, v. 127, n. 2, p. 145–154, 2009.

FREY, M. K.; POTHURI, B. Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature. *Gynecologic Oncology Research and Practice*, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2017.

GHOSH, S.; DASS, J. F. P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- $\kappa$ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene*, v. 584, n. 1, p. 97–109, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.008>>.

GIOPANO, I. *et al.* Metadherin, p50, and p65 expression in epithelial ovarian neoplasms: An immunohistochemical study. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

GIORNELLI, G. H. Management of relapsed ovarian cancer: a review. *SpringerPlus*, v. 5, n. 1, 2016.

GIULIANI, C.; BUCCI, I.; NAPOLITANO, G. The role of the transcription factor Nuclear Factor-kappa B in thyroid autoimmunity and cancer. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, n. AUG, p. 1–8, 2018.

GODWIN, P. *et al.* Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, v. 3 MAY, n. May, p. 1–10, 2013.

GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes and Development*, v. 32, n. 19–20, p. 1267–

1284, 2018.

GRAHAM, B.; GIBSON, S. B. The two faces of NF $\kappa$ B in cell survival responses. *Cell Cycle*, v. 4, n. 10, p. 1342–1345, 2005.

GREER, Y. E. *et al.* MEDI3039, a novel highly potent tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 2 agonist, causes regression of orthotopic tumors and inhibits outgrowth of metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, v. 21, n. 1, p. 1–17, 2019.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>>.

GUNDLACH, J. P. *et al.* Cytoplasmic TRAIL-R1 is a positive prognostic marker in PDAC. *BMC Cancer*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

GUPTA, I. *et al.* Molecular genetics complexity impeding research progress in breast and ovarian cancers. *Molecular and Clinical Oncology*, v. 7, n. 1, p. 3–14, 2017.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008.

HERNANDEZ, L. *et al.* A dual role for Caspase8 and NF- $\kappa$ B interactions in regulating apoptosis and necroptosis of ovarian cancer, with correlation to patient survival. *Cell Death Discovery*, v. 1, n. 1, 2015.

HUANG, W. *et al.* Proteasome inhibitor YSY01A enhances cisplatin cytotoxicity in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Journal of Cancer*, v. 7, n. 9, p. 1133–1141, 2016.

HUMPHREYS, L.; ESPONA-FIEDLER, M.; LONGLEY, D. B. FLIP as a therapeutic target in cancer. *FEBS Journal*, v. 285, n. 22, p. 4104–4123, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES (INCA). O que é câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: Abril/2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES (INCA). Câncer de Ovário. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-ovario>. Acesso em: Abril/2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). GLOBAL CANCER OBSERVATORY. Cancer facts sheets. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Acesso em Abril/2020.

JAVADI, S. *et al.* Ovarian cancer, the revised FIGO staging system, and the role of imaging. *American Journal of Roentgenology*, v. 206, n. 6, p. 1351–1360, 2016.

JONAS, K.; CALIN, G. A.; PICHLER, M. RNA-Binding Proteins as Important Regulators of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 8, p. 2969, 2020.

KAMPAN, N. C. *et al.* Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

KHAIDER, N. G. *et al.* Targeted ovarian cancer treatment: the TRAILs of resistance. *American journal of cancer research*, v. 2, n. 1, p. 75–92, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22206047>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articl>

render.fcgi?artid=PMC3236573>.

KIM, M. G. *et al.* The relationship between cisplatin resistance and histone deacetylase isoform overexpression in epithelial ovarian cancer cell lines. *Journal of Gynecologic Oncology*, v. 23, n. 3, p. 182–189, 2012.

KOJIMA, Y. *et al.* Importin  $\beta$ 1 protein-mediated nuclear localization of Death Receptor 5 (DR5) limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 50, p. 43383–43393, 2011

KOSHIYAMA, M.; MATSUMURA, N.; KONISHI, I. Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics*, v. 7, n. 1, p. 12, 2017.

KURMAN, R. J.; SHIH, I. M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer - Shifting the paradigm. *Human Pathology*, v. 42, n. 7, p. 918–931, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>>.

KURMAN, R. J.; SHIH, I. M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: A proposed unifying theory. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 34, n. 3, p. 433–443, 2010.

LAVOUÉ, V. *et al.* Can new molecular profiles in epithelial ovarian cancer modify therapeutics? *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, v. 46, n. 2, p. 107–112, 2017.

LEGLER, K. *et al.* The novel TRAIL-receptor agonist APG350 exerts superior therapeutic activity in pancreatic cancer cells. *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 5, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0478-0>>.

LETAI, A. Apoptosis and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, v. 1, n. 1, p. 275–294, 6 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cancerbio-050216-121933>>.

LHEUREUX, S.; BRAUNSTEIN, M.; OZA, A. M. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, p. 280–304, 2019.

LI, L. C. *et al.* Knockdown of MADD and c-FLIP overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 205, n. 4, p. 362.e12-362.e25, 2011.

LI, B. X. *et al.* Novel smac mimetic APG-1387 elicits ovarian cancer cell killing through TNF-alpha, Ripoptosome and autophagy mediated cell death pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 37, n. 1, p. 1–15, 2018.

LIU, P.; MAO, H.; HOU, P. Synergistic antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand combined with cisplatin in ovarian carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 16, n. 2, p. 538–548, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, v. 96, n. 2, p. 147–152, 2000.

LU, J. *et al.* Mild oxidative stress induced by a low dose of cisplatin contributes to the escape of TRAIL-mediated apoptosis in the ovarian cancer SKOV3 cell line. *Oncology Reports*, v.

35, n. 6, p. 3427–3434, 2016.

LUVERO, D. *et al.* Ovarian cancer relapse: From the latest scientific evidence to the best practice. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 140, n. March, p. 28–38, 2019.

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, v. 53, n. 2, p. 148–158, 2019.

MARTINHO, N. *et al.* Cisplatin-membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity. *Frontiers in Physiology*, v. 10, n. JAN, p. 1–15, 2019.

MEISNER, N. C.; FILIPOWICZ, W. Properties of the regulatory RNA-binding protein HuR and its role in controlling miRNA repression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 700, p. 106–123, 2010.

MENG, M.-B. *et al.* Oncotarget 57391 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget*, v. 7, n. 35, [S.d.]. Disponível em: <[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)>.

MÉRINO, D. *et al.* Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2. *Molecular and Cellular Biology*, v. 26, n. 19, p. 7046–7055, 2006.

MOMENIMOVAHED, Z. *et al.* Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, v. 11, p. 287–299, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAOUM, G. E. *et al.* Journey of TRAIL from bench to bedside and its potential role in immuno-oncology. *Oncology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 26–42, 2017.

NARAYAN, G. *et al.* Epigenetic inactivation of TRAIL decoy receptors at 8p12-21.3 commonly deleted region confers sensitivity to Apo2L/trail-Cisplatin combination therapy in cervical cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, v. 55, n. 2, p. 177–189, fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.22325>>.

NAVAL, J. *et al.* Importance of trail molecular anatomy in receptor oligomerization and signaling. Implications for cancer therapy. *Cancers*, v. 11, n. 4, 2019.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, p. 1–15, 2009.

O'LEARY, L. *et al.* Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: The role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene*, v. 35, n. 10, p. 1261–1270, 2016.

OTSUKA, H. *et al.* Emerging evidence of translational control by AU-rich element-binding proteins. *Frontiers in Genetics*, v. 10, n. MAY, p. 1–10, 2019.

PALMIROTTA, R. *et al.* Ovarian cancer: Novel molecular aspects for clinical assessment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 117, p. 12–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.06.007>>.

PARK, M.; HONG, J. Roles of NF- $\kappa$ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, v. 5, n. 2, p. 15, 2016.

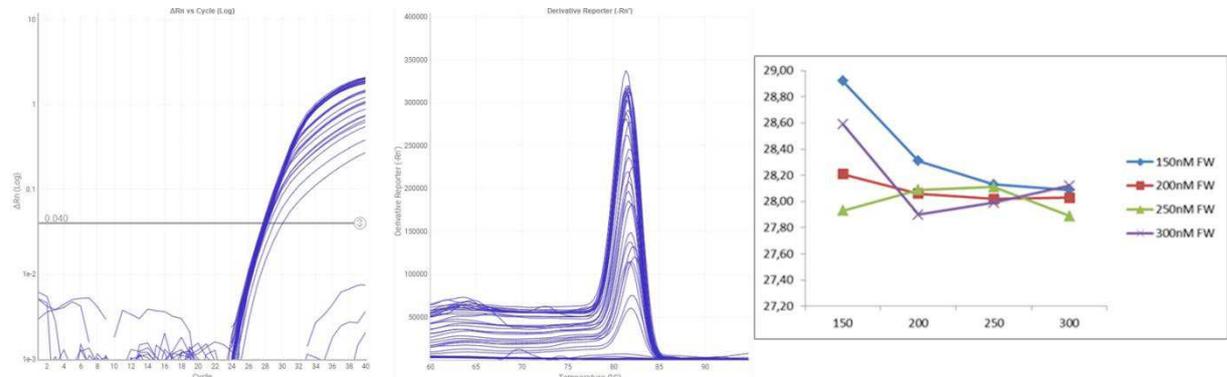
- PINEDA, D. M. *et al.* HuR's post-transcriptional regulation of death receptor 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, v. 13, n. 10, p. 946–955, 2012.
- PITT, J. M. *et al.* Targeting the tumor microenvironment: Removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1482–1492, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw168>>.
- POKHRIYAL, R. *et al.* Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients. *Biomarkers in Cancer*, v. 11, p. 1179299X1986081, 2019.
- POPP, M. W.; MAQUAT, L. E. Nonsense-mediated mRNA Decay and Cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 48, n. 3, p. 44–50, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>>.
- PRAT, J. *et al.* Staging Classification for Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum: Abridged Republication of Guidelines From the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). *Obstetrics and Gynecology*, v. 126, n. 1, p. 171–174, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>>.
- QIN, X. *et al.* The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1871, n. 2, p. 259–266, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.006>>.
- REFAAT, A.; ABD-RABOU, A.; REDA, A. Trail combinations: The new “trail” for cancer therapy (review). *Oncology Letters*, v. 7, n. 5, p. 1327–1332, 2014.
- REIS, C. R. *et al.* TRAIL-death receptor endocytosis and apoptosis are selectively regulated by dynamin-1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 3, p. 504–509, 2017.
- ROJAS, V. *et al.* Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: Implications for diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 12, 2016.
- SAFA, A. R.; POLLOK, K. E. Targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for cancer therapy. *Cancers*, v. 3, n. 2, p. 1639–1671, 2011.
- SAMBROOK, J. RUSSELL, D.W. Agarose Gel Electrophoresis. *CSH Protocols*; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4020.
- SARHAN, D.; D'ARCY, P.; LUNDQVIST, A. Regulation of TRAIL-receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 10, p. 18557–18573, 2014.
- SCHUSTER, S. L.; HSIEH, A. C. The Untranslated Regions of mRNAs in Cancer. *Trends in Cancer*, v. 5, n. 4, p. 245–262, abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405803319300299>>.
- SHALOAM, D.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 364–378, 2014.
- SHAN, B. *et al.* Necroptosis in development and diseases. *Genes and Development*, v. 32, n. 5–6, p. 327–340, 2018.
- SOLOMON, L. A. *et al.* Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by genistein: the role of NF-kappaB. *Journal of Ovarian Research*, v. 1, n. 1, p. 9, 2008.
- STORDAL, B. *et al.* Resistance to paclitaxel in a cisplatin-resistant ovarian cancer cell line is mediated by P-glycoprotein. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, 2012.

- STUCKEY, D. W.; SHAH, K. TRAIL on trial: Preclinical advances in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, v. 19, n. 11, p. 685–694, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.08.007>>.
- TANIDA, S. *et al.* Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *International Journal of Surgical Oncology*, v. 2012, p. 1–8.
- TATE, J. G. *et al.* COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D941–D947, 2019.
- TWOMEY, J. D. *et al.* Spatial dynamics of TRAIL death receptors in cancer cells. *Drug Resistance Updates*, v. 19, p. 13–21, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.02.001>>.
- VAN ZYL, B.; TANG, D.; BOWDEN, N. A. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: What can we use to improve treatment. *Endocrine-Related Cancer*, v. 25, n. 5, p. R303–R318, 2018.
- VERGOTE, I. Novel therapies, including enzastaurin, in the treatment of ovarian cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 23, n. 5, p. 579–598, 2014.
- VON KARSTEDT, S.; MONTINARO, A.; WALCZAK, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 6, p. 352–366, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.28>>.
- WAJANT, H. Molecular mode of action of TRAIL receptor agonists—Common principles and their translational exploitation. *Cancers*, v. 11, n. 7, 2019.
- WANG, J. *et al.* Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 5, p. 10015–10041, 2013.
- WANG, Q. *et al.* Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, n. 2, p. 466–471, 2000.
- WANG, S. SHAN *et al.* miR-133a Promotes TRAIL Resistance in Glioblastoma via Suppressing Death Receptor 5 and Activating NF- $\kappa$ B Signaling. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 8, n. September, p. 482–492, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.015>>.
- WANG, T. *et al.* Necroptosis in cancer: An angel or a demon? *Tumor Biology*, v. 39, n. 6, 2017.
- WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.
- WEINLICH, R.; GREEN, D. R. The Two Faces of Receptor Interacting Protein Kinase-1. *Molecular Cell*, v. 56, n. 4, p. 469–480, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.001>>.
- WIEZOREK, J.; HOLLAND, P.; GRAVES, J. Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 16, n. 6, p. 1701–1708, 2010.
- WILEY, S. R. *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, v. 3, n. 6, p. 673–682, 1995.

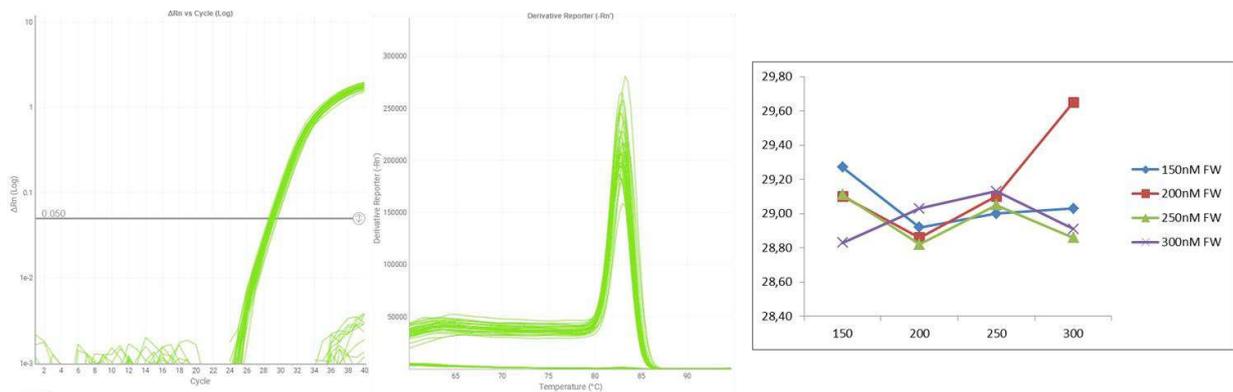
- WILLMS, A. *et al.* Impact of p53 status on TRAIL-mediated apoptotic and non-apoptotic signaling in cancer cells. *PLoS ONE*, v. 14, n. 4, p. 1–17, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0214847>>.
- WITTRUP, A.; LIEBERMAN, J. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, v. 16, n. 9, p. 543–552, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3978>>.
- XIE, P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *Journal of Molecular Signaling*, v. 8, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Journal of Molecular Signaling>.
- YUAN, D. *et al.* Extracellular miR-1246 promotes lung cancer cell proliferation and enhances radioresistance by directly targeting DR5. *Oncotarget*, v. 7, n. 22, p. 32707–32722, 2016.
- YUAN, Z. Q. *et al.* Mesenchymal stromal cell delivery of full-length tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy. *Cytotherapy*, v. 17, n. 7, p. 885–896, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.603>>.
- ZAULI, G. *et al.* Levels of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) show a long-term stability in the breast milk of mothers of preterm infants. *Journal of Human Lactation*, v. 29, n. 3, p. 350–353, 2013.
- ZHANG, X. D. *et al.* Differential Localization and Regulation of Death and Decoy Receptors for TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in Human Melanoma Cells. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 8, p. 3961–3970, 2000.
- ZHANG, Y. *et al.* TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Translational Cancer Research*, v. 5, n. 6, p. 650–663, 2016.
- ZHANG, X. Y. *et al.* Translational Control of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Death Receptor Expression in Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 11, p. 10606–10614, 2004.
- ZHAO, J.; LU, Y.; SHEN, H. M. Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, v. 314, n. 1, p. 8–23, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.040>>.
- ZHENG, X. LIAN *et al.* RIP1 promotes proliferation through G2/M checkpoint progression and mediates cisplatin-induced apoptosis and necroptosis in human ovarian cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, n. July 2019, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41401-019-0340-7>>.
- ZIMMER, A. M. *et al.* Loss-of-function approaches in comparative physiology: Is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *Journal of Experimental Biology*, v. 222, n. 7, 2019.

## 7. ANEXOS

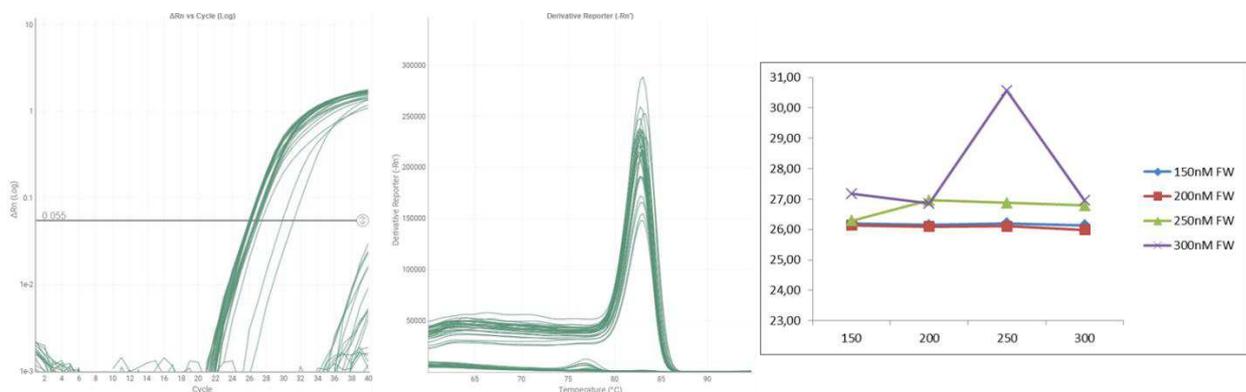
### 1 - OTIMIZAÇÃO DOS INICIADORES



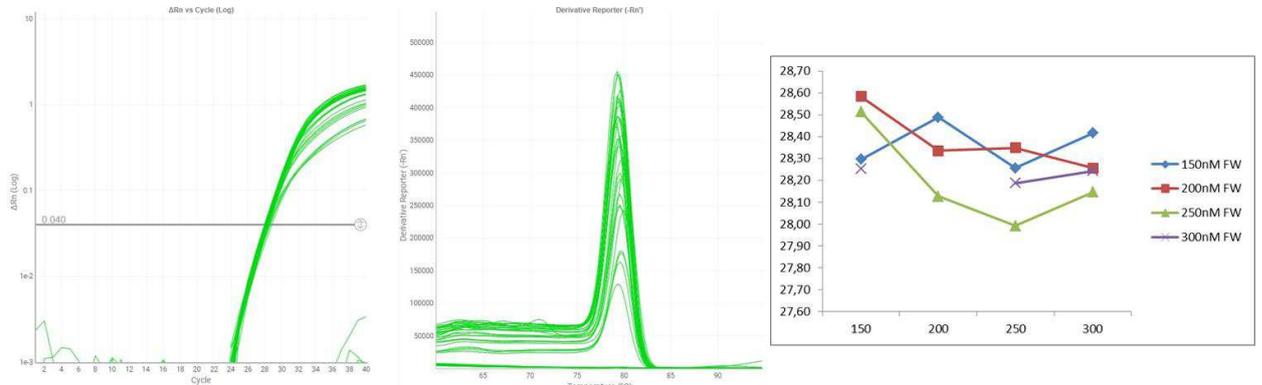
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *TRAIL-R1* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *TRAIL-R1*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 250 nM FW/300 nM RV.



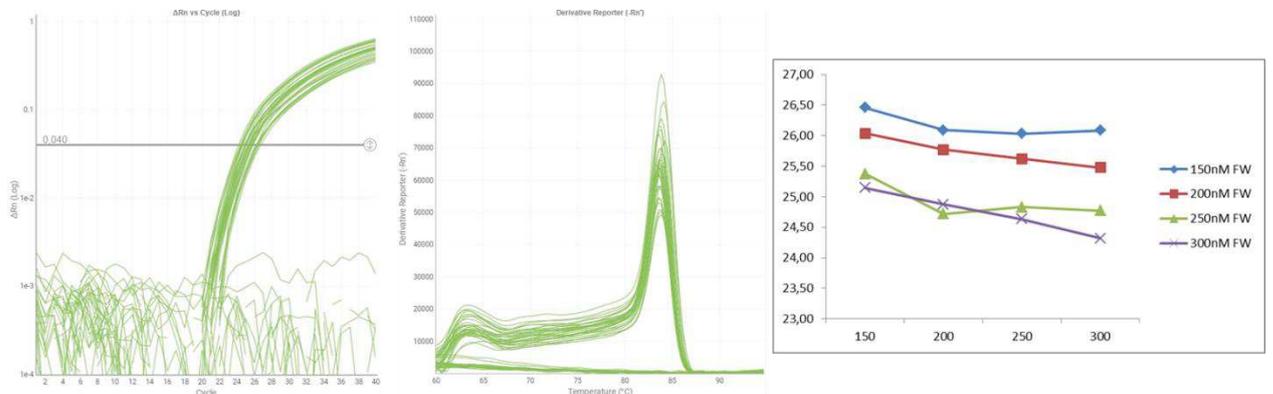
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *TRAIL-R2* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *TRAIL-R2*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 250 nM FW/200 nM RV.



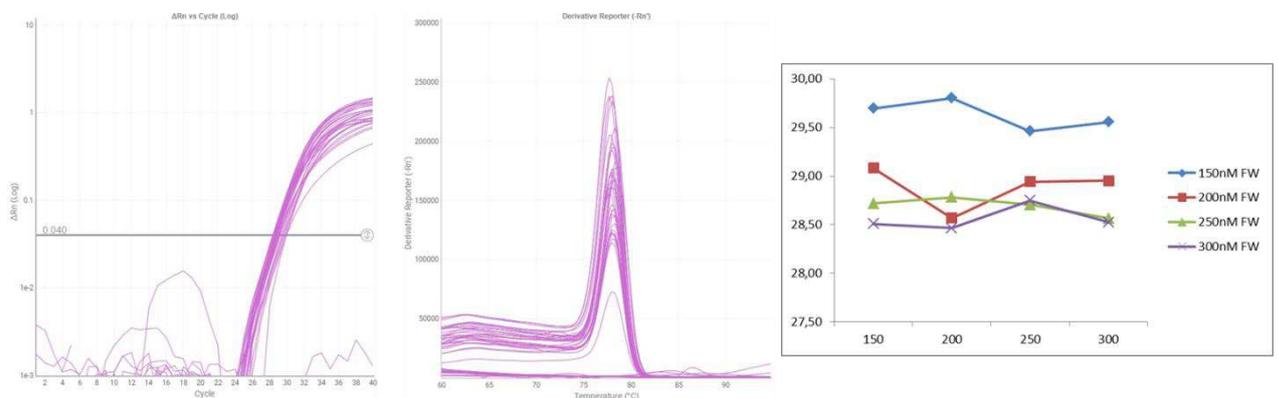
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *TRAIL-R3* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *TRAIL-R3*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 200 nM FW/300 nM RV.



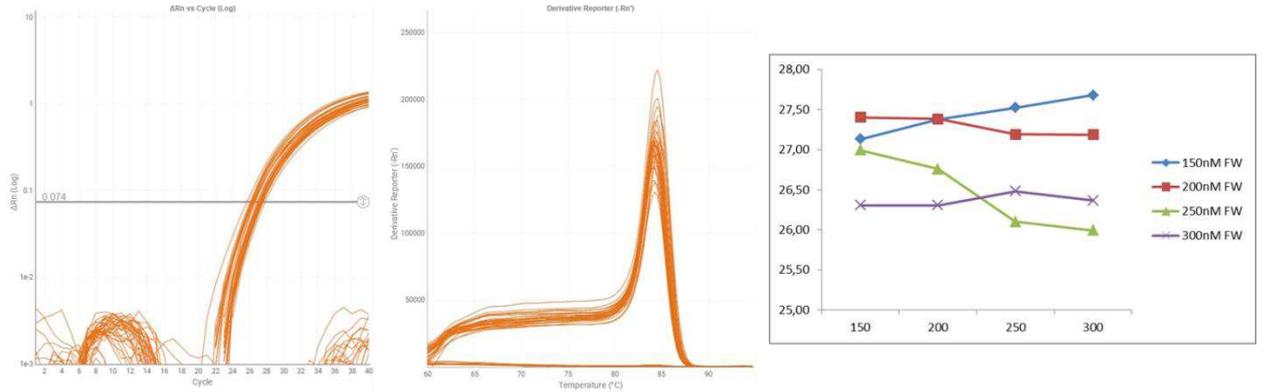
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *TRAIL-R4* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *TRAIL-R4*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 250 nM FW/250 nM RV.



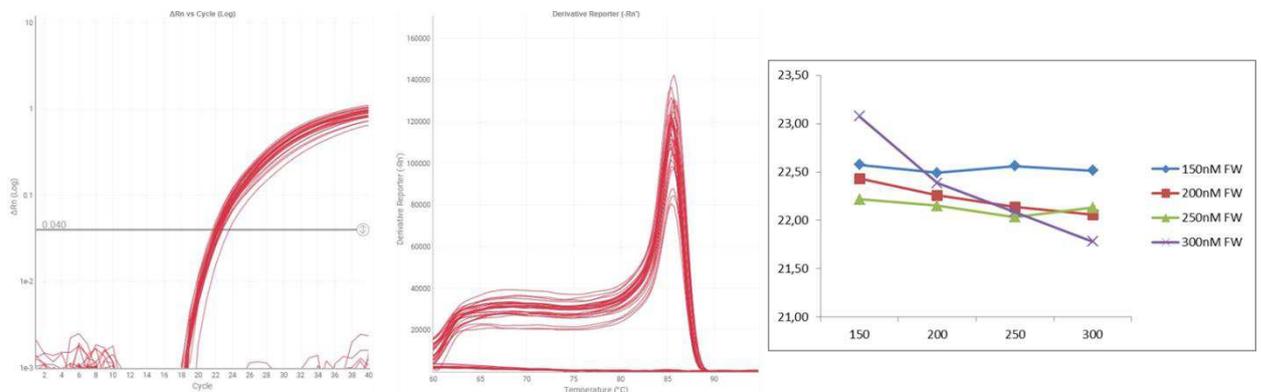
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *RIPK1* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *RIPK1*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/300 nM RV.



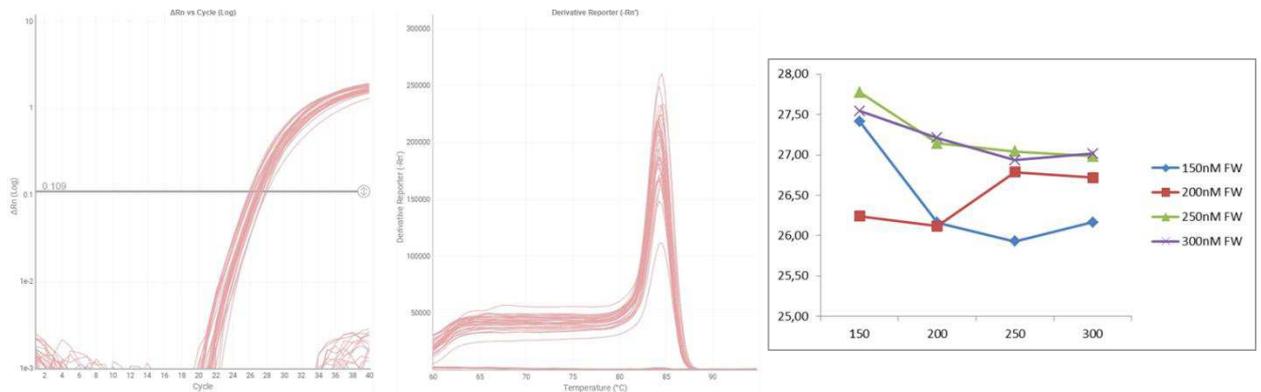
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *MLKL* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *MLKL*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/200 nM RV.



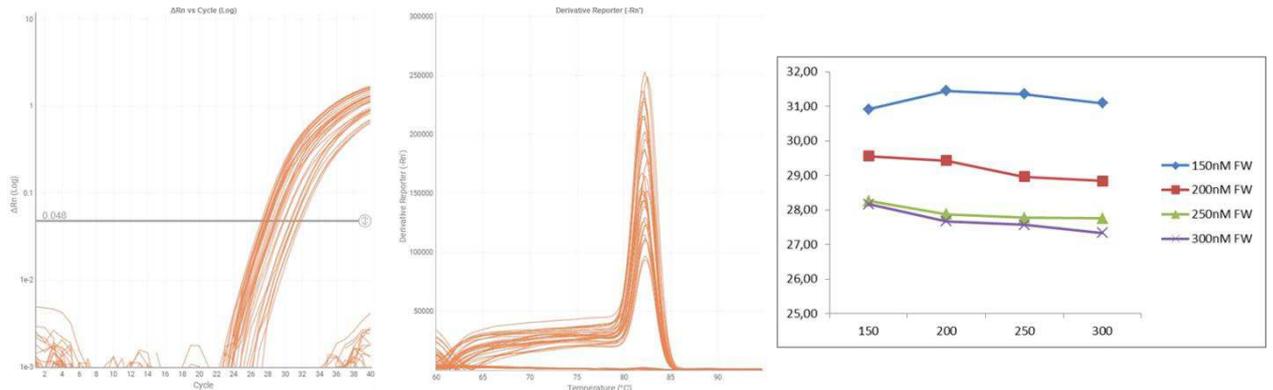
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *NFKB1* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *NFKB1*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/200 nM RV.



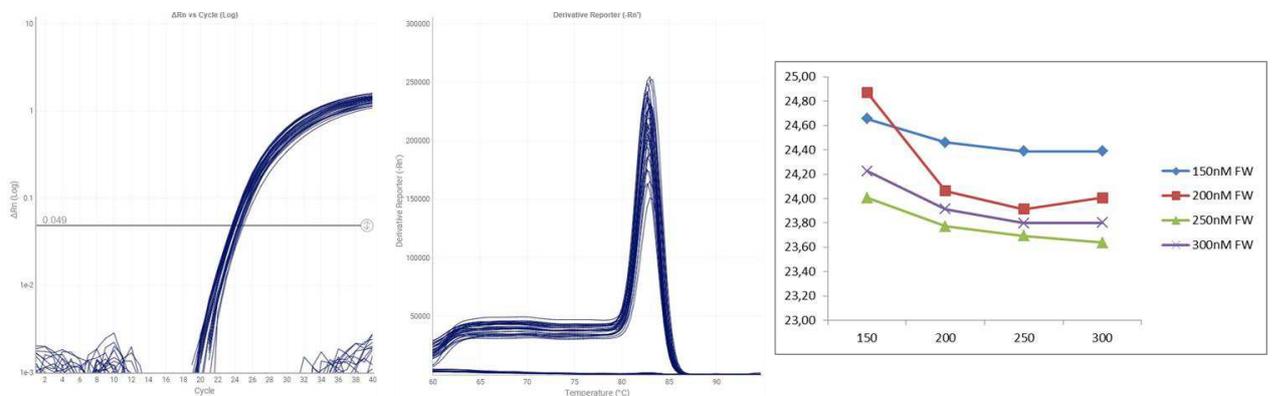
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *RELA* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *RELA*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/300 nM RV.



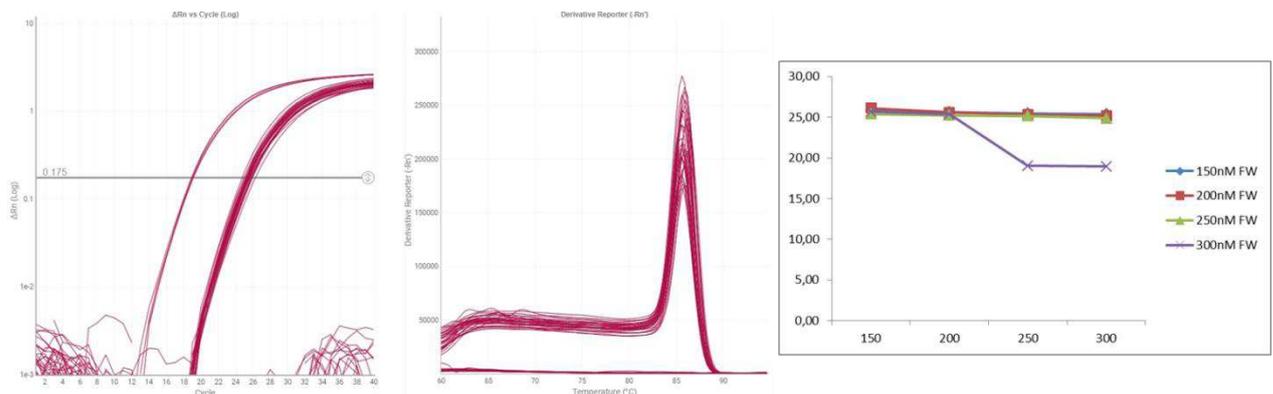
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *TP53* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *TP53*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 150 nM FW/250 nM RV.



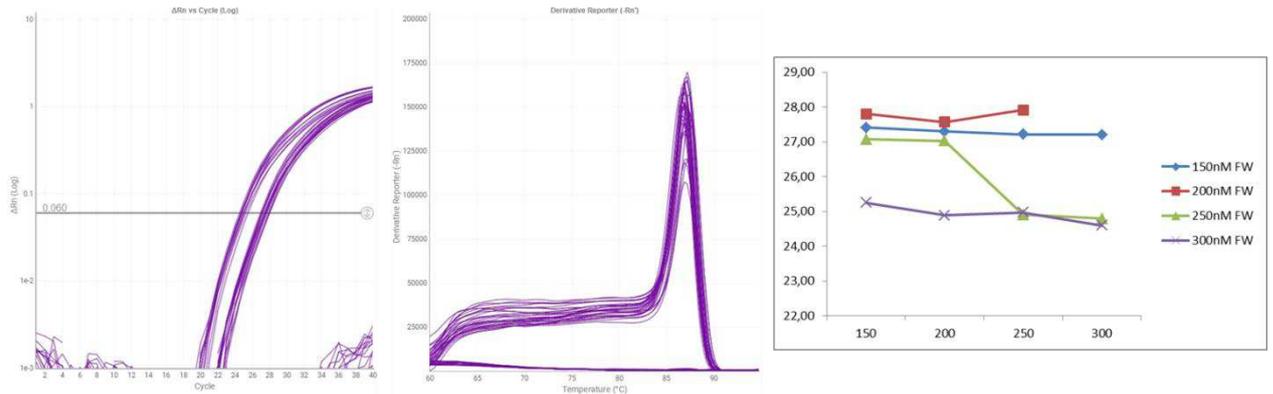
Otimização da concentração dos iniciadores do gene *CASP8* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *CASP8*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/300 nM RV.



Otimização da concentração dos iniciadores do gene *CFLAR* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *CFLAR*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 250 nM FW/200 nM RV.



Otimização da concentração dos iniciadores do gene *RPL13A* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *RPL13A*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/300 nM RV.



Otimização da concentração dos iniciadores do gene *ALAS1* por RT-qPCR. Curva de amplificação e dissociação obtidas da reação de RT-qPCR para a otimização dos iniciadores de *ALAS1*. Menor valor de Ct obtido nas concentrações 300 nM FW/300 nM RV.