

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

**O ESTUDO DA PDE7 COMO NOVO ALVO TERAPÊUTICO EM POTENCIAL
NO CÂNCER DE OVÁRIO**

NAYARA GUSMÃO TESSAROLLO

VITÓRIA

JULHO/ 2017

NAYARA GUSMÃO TESSAROLLO

**O ESTUDO DA PDE7 COMO NOVO ALVO TERAPÊUTICO EM POTENCIAL NO
CÂNCER DE OVÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA-ES
JULHO/ 2017

NAYARA GUSMÃO TESSAROLLO

**O ESTUDO DA PDE7 COMO NOVO ALVO TERAPÊUTICO EM POTENCIAL NO
CÂNCER DE OVÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração Saúde.

Aprovada em 20 de Julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Sandra Ventorin Von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Ian Victor Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Rita Gomes Wanderley Pires
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Juliana B. Coitinho Goncalves
Universidade Federal do Espírito Santo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

T338e Tessarollo, Nayara Gusmão, 1987 -
O estudo da PDE7 como novo alvo terapêutico em potencial no câncer
de ovário / Nayara Gusmão Tessarollo – 2017.
145 f. : il.

Orientador(a): Leticia Batista Azevedo Rangel.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias Ovarianas. 2. Tratamento Farmacológico. I. Rangel, Leticia
Batista Azevedo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS (ACKNOWLEDGMENT)

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho, guiar meus passos e tornar tudo isso possível.

Ao meu pai, à minha mãe e à Rayelle pelo amor incondicional, pela força em todos os momentos e por acreditarem em mim.

À minha orientadora, Leticia B. A. Rangel, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pelas oportunidades e orientação durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o nosso convite.

Aos membros do LBCMCH, pela amizade, carinho e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao Criobanco por disponibilizar o seu espaço e infra-estrutura.

Ao Dr. Ie-Ming Shih por me receber no *Molecular Genetics Laboratory of Female Reproductive Cancer* da Johns Hopkins University durante meu doutorado sanduíche.

À Yuyu pela supervisão no desenvolvimento dos experimentos durante o período de doutorado sanduíche no *Molecular Genetics Laboratory of Female Reproductive Cancer* na Johns Hopkins University. (To Yuyu for supervising my studies during the sandwich doctoral period at the Molecular Genetics Laboratory of Female Reproductive Cancer at Johns Hopkins University).

À Profa. Dra. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelos experimentos de dosagem de citocinas.

À Profa. Dra. Etel R. P. Gimba, do Grupo de Biomarcadores Neoplásicos no Instituto Nacional do Câncer, pelos experimentos de imunoblotting.

Ao Prof. João Carlos Aquino de Almeida e à doutoranda Leide Laura Figueiredo Maciel, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, pela parceria nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Ao Prof. Dr. Ian Victor Silva do Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento da Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa e à Profa. Dra. Rita de Cassia Ribeiro Goncalves, do Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo uso do leitor de Elisa.

À Profa. Dra Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem, do Laboratório de Bioquímica Clínica e Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo uso do termociclador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por conceder as bolsas de doutorado e de doutorado sanduíche.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia pelo uso do equipamento Chemidoc.

RESUMO

O câncer de ovário (CAOV) configura a principal causa de morte entre os tumores ginecológicos. Apesar dos avanços significativos nas pesquisas a respeito deste tumor, o tratamento do CAOV ainda enfrenta importantes desafios, dentre eles a quimiorresistência. Dentre os potenciais alvos no tratamento do CAOV, destaca-se a fosfodiesterase 7-A (PDE7-A). Esta enzima tem como função a degradação de monofosfato de adenosina cíclico para monofosfato de adenosina. Neste contexto, este trabalho apresenta como objetivo geral investigar o papel e os possíveis mecanismos de ação da PDE7 no carcinoma ovariano. Dados prévios de RNA-seq mostraram maior expressão da enzima PDE7-A em carcinoma ovariano seroso comparado à tuba de falópio. À luz do exposto, ensaios de viabilidade celular metabólica (VCM) foram conduzidos em duas linhagens de CAOV, A2780 e OVCAR3, utilizando o inibidor seletivo da isoforma da PDE7, denominado BRL50481, em monoterapia e em associação aos quimioterápicos cisplatina (CISP) e paclitaxel (PTX). Nossos resultados mostraram que o uso do inibidor BRL50481, em monoterapia, reduziu a VCM das células A2780 em torno de 60% de modo dose-dependente no tempo de tratamento de 48h. Embora o tratamento com BRL50481 em monoterapia na linhagem OVCAR3 não tenha alterado a VCM, sua associação à CISP promoveu redução da VCM na referida linhagem em 48h de tratamento. Já a associação de BRL50481 e PTX promoveu inibição da VCM em ambas as linhagens analisadas. Observou-se ainda um aumento na potência de PTX na politerapia, aspecto verificado com a diminuição da IC_{50} do mesmo em relação à monoterapia. Verificou-se ainda a cronologia do tratamento na sobrevivência celular. Assim, o pré-tratamento da linhagem A2780 com 200 μ M de BRL50481, seguido do tratamento associado de BRL50481 e PTX proporcionou redução na VCM em torno de 70% comparado ao tratamento com PTX em monoterapia. Para OVCAR3, o pré-tratamento com 400 μ M de BRL50481 proporcionou uma redução da VCM em torno de 20%. Dessa forma, nossos dados mostraram o efeito benéfico da associação entre o inibidor de PDE7 e PTX, o que possibilitou uma redução da concentração de PTX utilizada nas linhagens A2780 e OVCAR3 em cerca de $82,7 \times 10^8$ e $80,4 \times 10^3$ vezes, respectivamente. Ademais, investigou-se os possíveis mecanismos de ação envolvidos na inibição da PDE7. Foi observado que a inibição de PDE7 não afeta a progressão do ciclo celular. Ainda, a combinação de BRL50481 e PTX promoveu o aumento da necrose celular em OVCAR3. Além disso, o pré-tratamento da OVCAR3 com BRL50481 modulou a expressão gênica das citocinas IL-6, IL-1 α e IL-1 β , bem como aumentou a secreção de IL-6. A combinação de BRL50481 e PTX ainda modulou negativamente a via de sinalização celular PI3K/AKT/mTOR em ambas as linhagens estudadas. Adicionalmente, o pré-tratamento da A2780 aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Verificou-se ainda que a morte celular pode estar relacionada à indução de autofagia nos dois modelos de estudo. Também foi observado que a expressão de CLDN-16 é modulada pelas vias de PKC, PI3K/AKT e PKA e, inibindo PDE7, observou-se uma maior expressão de CLDN-16. Análises de imunohistoquímica revelaram que 80% dos casos analisados superexpressam esta proteína. Interessantemente, trata-se de uma expressão anômala posto que, todos os casos que apresentam expressão da CLDN-16, a mesma encontra-se restrita ao citoplasma das células. Estes estudos contribuíram para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na proliferação celular do CAOV, possibilitando a exploração de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Câncer de ovário. PDE7-A. Quimioterapia.

ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the leading cause of death among gynecological tumors. Despite significant advances in this kind of tumor research, the treatment still faces significant challenges, including chemoresistance. Among the potential targets in the treatment of CAOV, highlight the phosphodiesterase 7-A (PDE7-A). This enzyme degrades the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) to adenosine monophosphate. In this context, this project aims to investigate the role of PDE7 and its mechanism of action in ovarian carcinoma. Previous data from RNA-seq showed higher expression of PDE7-A enzyme in ovarian serous carcinoma compared to the fallopian tube. Considering what has been said, metabolic cell viability assays (MCV) were conducted in two CAOV cell lines, A2780 and OVCAR3, using the selective PDE7 isoform inhibitor, designate BRL50481, in monotherapy and in combination with cisplatin (CISP) and paclitaxel (PTX). Our results showed that the use of the BRL50481 inhibitor in monotherapy reduced the A2780 cells MCV by about 60% in a dose-dependent manner in the 48 hour treatment. Although the treatment with BRL50481 in monotherapy in OVCAR3 cell line did not change the MCV, its association with CISP in 48 hour-treated cell, promoted a reduction of MCV. On the other hand, the association of BRL50481 and PTX promoted inhibition of MCV in both cell lines analyzed. An increase in the potency of PTX was also observed, an aspect verified with the reduction of the IC_{50} of PTX in relation to monotherapy. The treatment chronology in cell survival was also verified. Thus, pretreatment of A2780 with 200 μ M BRL50481 followed by the associated treatment of BRL50481 and PTX promoted a reduction in MCV of around 70% compared to the treatment with PTX alone. For OVCAR3, 400 μ M pretreatment of BRL 50481 provided a VCM reduction of about 20%. Therefore, our data showed beneficial effect between the PDE7 inhibitor and PTX, which allowed a reduction of the PTX concentration used in A2780 and OVCAR3 by about 82.7×10^8 and 80.4×10^3 times, respectively. Moreover, the possible mechanisms of action involved in the inhibition of PDE7 have been investigated. It has been observed that the PDE7 inhibition does not affect cell cycle progression. Furthermore, the combination of BRL50481 and PTX promoted increased cell necrosis in OVCAR3. In addition, pretreatment of the OVCAR3 with BRL50481 modulated the gene expression of the cytokines IL-6, IL-1 α and IL-1 β , as well as increased IL-6 secretion. The combination of BRL50481 and PTX further modulated negatively the PI3K / AKT / mTOR cell signaling pathway in both cell lines studied. In addition, the A2780 pre-treated cells showed an increase in the expression of the pro-apoptotic Bax protein. Still, cell death may be related to the induction of autophagy in the two study models. It has also been observed that CLDN-16 expression is modulated by the PKC, PI3K/AKT and PKA pathways and, by inhibiting PDE7, a greater expression of CLDN-16 was verified. Immunohistochemical analyzes revealed that 80% of the analyzed cases overexpress this protein. Interestingly, this is an anomalous expression, since in all the cases that showed expression of CLDN-16, it was restricted to the cytoplasm of the cells. These studies contributed to a better understanding of the mechanisms involved in the cellular proliferation of CAOV, allowing the exploration of new therapeutic strategies.

Key words: Ovarian cancer. PDE7-A. Chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Origem do CAO V	23
Figura 2: Mecanismos de resistência às drogas.	28
Figura 3: Esquema representando as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK. Adaptado de CARNERO; PARAMIO, 2014.	33
Figura 4: Junções ocludens e as proteínas claudinas.....	35
Figura 5: Sinalização das fosfodiesterases de nucleotídeo cíclico (PDE).....	37
Figura 6: Família PDE7 é composta por duas isoformas PDE7-A e PDE7-B. Em humanos, PDE7-A sofre <i>splicing</i> alternativo originando variantes PDE7-A1, PDE7-A2 e PDE7-A3.	38
Figura 7: Estrutura molecular do composto BRL50481.....	39
Figura 8: Expressão gênica diferencial entre amostras de tuba de falópio e pacientes com carcinoma ovariano seroso de alto grau baseado em dados de RNA-seq: <i>heat map</i> com conjunto de 243 genes o.	57
Figura 9: Principais vias canônicas alteradas a partir da análise dos dados do RNA-seq utilizando a ferramenta de bioinformática <i>Ingenuity pathway analysis (IPA)</i>	58
Figura 10: Validação do resultado de RNA-seq utilizando linhagens celulares por meio de qPCR (A) e <i>Western blot</i> (B).	59
Figura 11: Efeito do BRL50481 na VCM pelo método de MTT.	61
Figura 12: Efeito da combinação de BRL50481 e CISP na VCM pelo método de MTT em A2780.....	63
Figura 13: Efeito do pré-tratamento de BRL50481 na VCM pelo método de MTT em A2780.....	64
Figura 14: Efeito da combinação de BRL50481 e CISP na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.....	65
Figura 15: Efeito do pré-tratamento de BRL50481 na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.....	66
Figura 16: Mecanismos de resistência à cisplatina em mutantes de PKA.	69
Figura 17: Efeito da combinação de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em A2780.....	70
Figura 18: Efeito da combinação e do pré-tratamento de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em A2780.	72

Figura 19: Efeito do pré-tratamento de BRL 50481 associado com baixas concentrações de PTX na VCM de A2780 pelo método de MTT.....	73
Figura 20: Efeito da combinação de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em OVCAR.....	74
Figura 21: Efeito da combinação e do pré-tratamentode BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.....	75
Figura 22: Efeito do pré-tratamento de BRL50481 associado com baixas concentrações de PTX na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.....	76
Figura 23: Análise do efeito de BRL50481 no ciclo celular.	78
Figura 24: Ensaio de indução de apoptose utilizando Anexina V/IP na linhagem A2780.....	79
Figura 25: Ensaio de indução de apoptose utilizando Anexina V/IP na linhagem OVCAR3.....	80
Figura 26: Análise da expressão gênica das citocinas na linhagem A2780.	83
Figura 27: Análise da expressão gênica das citocinas na linhagem OVCAR3.....	85
Figura 28: Padrões de expressão de IL-1 em células tumorais e suas possíveis ações na malignidade tumoral.....	89
Figura 29: Dosagem da citocina IL-6 nas células da linhagem OVCAR3.....	91
Figura 30: Análise da expressão do marcador vimentina no fenótipo TEM.	93
Figura 31: Análise da expressão dos marcadores de CTT NANOG e OCT4.	96
Figura 32: Análise da expressão de AKT total e AKT fosforilado na linhagem A2780.	98
Figura 33: Análise da expressão de AKT total e AKT fosforilado na linhagem OVCAR3.....	99
Figura 34: Análise da expressão da proteína pró-apoptótica BAX na linhagem A2780.....	101
Figura 35: Análise da expressão da proteína pró-apoptótica BAX na linhagem OVCAR3.....	102
Figura 36: Análise da expressão de Beclina-1 na linhagem A2780.	104
Figura 37: Análise da expressão de Beclina-1 na linhagem OVCAR3.....	105
Figura 38: Análise da expressão de ERK total e ERK fosforilado na linhagem A2780.	107

Figura 39: Análise da expressão de ERK total e ERK fosforilado na linhagem OVCAR3.....	108
Figura 40: Análise da expressão de GSK β total e GSK β fosforilado na linhagem A2780.....	110
Figura 41: Análise da expressão de GSK β total e GSK β fosforilado na linhagem OVCAR3.....	110
Figura 42: Esquema mostrando as principais vias de sinalização moduladas pela enzima PDE7. Legenda: ponto de interrogação referente as moléculas as quais os níveis/atividade não foram avaliados.	111
Figura 43: Análise da expressão de claudina-16 na linhagem A2780.....	113
Figura 44: Análise da expressão de claudina-16 na linhagem A2780 após tratamento com inibidor de PDE7.....	116
Figura 45: Análise da expressão de claudina-16 na linhagem OVCAR3 após tratamento com inibidor de PDE7.....	117
Figura 46: Ensaio de migração celular na linhagem A2780.	118
Figura 47: Ensaio de migração celular na linhagem OVCAR3.....	119
Figura 48: Ensaio de formação de colônia.	121
Figura 49: Análise da expressão de claudina-16 no CAOv em plataformas de tissue array por imunohistoquímica. (A) Controle positivo (rim camundongo). (B) Carcinoma seroso de alto grau.....	123
Figura 50: Ensaio de microscopia eletrônica de varredura nas linhagens de CAOv.	124
Figura 51: Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão na linhagem A2780..	125
Figura 52: Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão na linhagem OVCAR3.	126
Figura 53: Os níveis de expressão relativa dos genes obtidos na análise do RNA seq nas amostras de tuba de Falópio e carcinoma seroso de alto grau foram validados por qPCR.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores usados na validação do RNA-seq por qPCR.	43
Tabela 2: Concentrações dos quimioterápicos utilizados de acordo com a linhagem celular de CAOv e o tempo de tratamento para o cálculo da IC ₅₀	44
Tabela 3: Condições experimentais utilizadas nos experimentos de ciclo celular nas linhagens A2780 e OVCAR3.	45
Tabela 4: Condições experimentais utilizadas nos ensaios e ANEXINA/IP nas linhagens A2780 e OVCAR3.	47
Tabela 5: Condições experimentais utilizadas nas análises de expressão gênica por de qPCR.	48
Tabela 6: Primers utilizados na análise da expressão gênica por de qPCR.	48
Tabela 7: Condições experimentais utilizadas na análise da expressão protéica.	50
Tabela 8: Condições experimentais utilizadas nos experimentos de análise da expressão da proteína CLDN-16 nas linhagens A2780 e OVCAR3.	50
Tabela 9: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise da expressão protéica.	51
Tabela 10: Valor das IC ₅₀ estimadas nas linhagens A2780 e OVCAR3.	61
Tabela 11: Valor das IC ₅₀ estimadas para CISP em monoterapia e em associação com BRL50481 nas linhagens A2780 e OVCAR3.	66
Tabela 12: Valor das IC ₅₀ estimadas para PTX em monoterapia e em associação com BRL50481 nas linhagens A2780 e OVCAR3.	71

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Estadiamento FIGO e Prognóstico de CAO.V.....	25
Quadro 2: Descrição das características das linhagens celulares de CAO.V.	43
Quadro 3: Descrição das plataformas de tissue array utilizadas no experimento de imunohistoquímica.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ALDH - Aldeído desidrogenase
AKT - Proteína cinase B
APAF-1 - Fator de ativação de protease apoptótica 1
BRAF - Serina/treonina cinase pertencente à família B-Raf
BRCA1/2 - Oncogene do câncer de mama 1/2
BRL50481- Inibidor competitivo da fosfodiesterase 7
CAOV - Câncer de ovário
CA-125 - Antígeno do câncer 125
c-erbB1 - Receptor do fator de crescimento de epiderme
cGMP - Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
CD44 - Antígeno CD44
CD133 - Antígeno 133
CISP- Cisplatina
CLDN - Claudina
c-Met - Proto-oncogene Met/receptor tirosina cinase
CTT - Célula tronco tumoral
CXCL-1/2/8/12 - Quimiocina de motivo C-X-C Ligante 1/2/8/12
DAB - Cromógeno associado a peróxido de hidrogênio
DMSO- Dimetilsulfóxido
EGF - Fator de crescimento epidérmico
EGFR - Receptor de fator de crescimento epidérmico
ERK1/ERK2 - Cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares
EZH2 -Lisina N-Metil transferase 6
FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FKBP - Proteína de ligação FK506
JAK1 -Proteína tirosina cinase JAK1
JAK/STAT - Janus cinase/proteína transdução de sinal e ativador de transcrição
GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSK-3 β - Glicogênio sintase 3 cinase β (GSK-3 β)
HER2 - Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IL - Interleucina

IP- iodeto de propídeo
iPKA₅₋₂₄ -Inibidor amida da proteína cinase A dependente cAMP (5-24)
JAM - Moléculas de adesão juncionais
JO - Junções ocludens
KRAS- Oncogene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
MAPK - Proteína cinase ativada por agentes mitogênicos
mRNA - RNA mensageiro
mTOR - Serina/treonina cinase alvo de rapamicina em mamífero
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NANOG - Homeobox Nanog
NFkB- Fator Nuclear Kappa B
OCT4 - Fator transcricional ligante de octâmero 4
PARP - Poli ADP-ribose polimerase 1
PBS - Tampão salino- fosfato
PDE -Fosfodiasterase
PDK1 - Proteína cinase-1 dependente de 3-fosfoinositol
PMA - Forbol 12-miristato 13-acetato
PIP2 - Fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PIP3 -Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PI3K- Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase
PI3KCA - Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase subunidade catalítica alfa
PKA - Proteína cinase A
PKC - Proteína cinase C
PLD- Doxorrubicina lipossomal peguilada
PTEN - Gene homólogo à tensina e fosfatase
PTX - Paclitaxel
p53 - Proteína Tumoral p53
qPCR - PCR em tempo real
SOCS3 - Supressor de citocina sinalização 3
Sox 10 - Fator transcricional Sox10
STICS - Carcinoma seroso de alto grau intra-epitelial tubal
RHEB - Proteína homóloga ao RAS enriquecida no cérebro
SHP-2 -Proteína tirosina fosfatase/ sem receptor tipo 11
Snail - Repressor transcricional 1 da família Snail

SLUG -Repressor transcricional 2 da família Snail
STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
SOX2 - Fator transcricional SOX2
TBS - Solução salina tamponada com Tris
TBS -T- Solução salina tamponada com Tris acrescido Tween 20
TEM - Transição epitélio-mesênquimal
TGFβ1- Fator de crescimento de transformação β 1
TLR4 - Receptor do tipo *toll* 4
TNF - Fator necrose tumoral
TREM1 - Antígeno CD354
TSC1- Complexo esclerose tuberosa 1
TSC2 - Complexo esclerose tuberosa 2
TWIST -Fator transcricional 1 da família BHLH Twist
VEGF - Fator de crescimento endotelial
Zeb1/2- Homeobox 1 ligação E-box Dedo Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CAOVS.....	21
2.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CAOVS.....	21
2.3 DIAGNÓSTICO DO CAOVS.....	24
2.4 TRATAMENTO DO CAOVS.....	26
2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA.....	27
2.6 VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR PI3K/AKT/MTOR E MAPK/ERK.....	30
2.7 JUNÇÕES OCLUDENS.....	33
2.8 FOSFODIESTERASES E O CÂNCER.....	36
3 OBJETIVO GERAL	40
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 VALIDAÇÃO DO RNA-SEQ POR QPCR E IMUNOBLOT.....	42
4.2 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	43
4.3 ENSAIO DA VIABILIDADE METABÓLICA CELULAR.....	44
4.4 CICLO CELULAR.....	45
4.5 ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR ANEXINA/IODETO DE PROPÍDEO.....	45
4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (QPCR).....	47
4.7 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE CELULAR.....	49
4.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	49
4.9 IMUNOBLOT.....	50
4.10 MIGRAÇÃO CELULAR.....	51
4.11 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	52
4.12 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	52

4.13 MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARECURRA.....	54
4.14 MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	54
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE AMOSTRAS DE TUBA DE FALÓPIO E CARCINOMA OVARIANO SEROSO DE ALTO GRAU A PARTIR DOS DADOS DE RNA-SEQ.....	56
5.2 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PDE7-A EM LINHAGENS CELULARES POR QPCR E IMUNOBLOT.....	57
5.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 UTILIZANDO BRL50481 EM MONOTERAPIA EM LINHAGENS DE CAO V.....	60
5.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 UTILIZANDO BRL50481 EM ASSOCIAÇÃO À CISPLATINA EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V.....	62
5.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 UTILIZANDO BRL50481 EM ASSOCIAÇÃO AO PACLITAXEL EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V.....	69
5.6 A INIBIÇÃO DE PDE7 NÃO AFETA A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	77
5.7 COMBINAÇÃO DE BRL50481 E PTX PROMOVEU O AUMENTO DA NECROSE CELULAR NA LINHAGEM OVCAR3.....	78
5.8 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM LINHAGENS DE CAO V.....	82
5.9 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS DE CAO V.....	90
5.10 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NA PLASTICIDADE EPITELIAL.....	92
5.11 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NO FENÓTIPO DE CTT NAS CÉLULAS DE CAO V A2780 E OVCAR3.....	94
5.12 AVALIAÇÃO DE VIAS CELULARES QUE PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE AÇÃO DE BRL50481.....	96
5.13 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DAS VIAS DE PKA, PKC E PI3K/AKT/MTOR NA EXPRESSÃO DE CLDN-16.....	111
5.14 A INIBIÇÃO DE PDE7 NÃO AFETOU A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS NAS LINHAGENS DE CAO V A2780 E OVCAR3.....	116

5.15 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V	120
5.16 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CLDN-16 EM AMOSTRAS DE CAO V ...	122
5.17 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	123
5.18 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	124
6. CONCLUSÃO	127
7. PERSPECTIVAS	128
REFERÊNCIAS	129
APÊNDICE A.....	144

1 INTRODUÇÃO

O câncer de ovário (CAOV) é o sétimo tipo tumoral mais comum entre as mulheres, configurando, paradoxalmente, a principal causa *mortis* por tumores ginecológicos (NEZHAT *et al.*, 2015; PRAT, 2014). O carcinoma ovariano pode ser dividido em três grupos histológicos: epitelial, estromal e de células germinativas, sendo que o epitelial corresponde a 90% dos casos diagnosticados da doença (ROSEN *et al.*, 2010). A agressividade do CAOV está associada, dentre outros fatores, à ausência de métodos eficazes de diagnóstico, à natureza assintomática de sua fase inicial e à detecção tardia da doença (LI *et al.*, 2012). De fato, as pacientes detectadas com CAOV em estadio inicial e responsivo à quimioterapia apresentam taxa de sobrevida em torno de 80-90%. Contudo, tais mulheres representam apenas 15-20% de toda a população de mulheres doentes (MODUGNO; EDWARDS, 2012). Em contraste, a maioria das mulheres é diagnosticada com CAOV em estadios avançados e metastáticos, já resistentes aos tratamentos quimioterápicos disponíveis na clínica.

O tratamento padrão contra o CAOV inclui cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia baseada em derivados de platina (cisplatina e carboplatina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel). Embora as pacientes com CAOV em estadio avançado apresentem taxa de resposta inicial satisfatória ao tratamento em torno de 80%, a sobrevida livre da doença destas mulheres é de apenas dezoito meses (HENNESSY *et al.*, 2009; PAES *et al.*, 2011). Atualmente, as abordagens diagnósticas para investigação do CAOV na prática clínica envolvem o exame pélvico, ultrassonografia e quantificação de níveis séricos do Antígeno do Câncer 125 (CA-125). Contudo, estas técnicas não são suficientemente precisas para a detecção precoce e acurada da doença, tal que o diagnóstico definitivo é obtido apenas após o exame histopatológico (FADER *et al.*, 2014).

Com o intuito de sobrepor as limitações diagnósticas e terapêuticas do CAOV, pesquisadores e clínicos têm se dedicado à descoberta de novos alvos celulares da doença. Ademais, terapias alternativas, sejam inéditas ou drogas em seu uso *off label*, vêm sendo exploradas como estratégias de combate ao CAOV. Nesse contexto, novos marcadores da doença emanam de estudos celulares e moleculares, sendo que, em alguns casos, pode-se vislumbrar aplicabilidade clínica futura dos mesmos tendo como base dados laboratoriais robustos e consistentes.

Em consonância ao exposto, o presente trabalho introduz uma molécula inédita com potencial de tratamento do CAOV, a fosfodiesterase 7 (PDE7). De fato, estudos de RNA-seq foram conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa em parceria com o pesquisador Ie-Ming Shih da Universidade Johns Hopkins, EUA, e mostraram a superexpressão de PDE7-A em tecidos de CAOV em comparação à tuba de falópio, tecido de origem do CAOV seroso de alto grau.

Vale notar que a modulação dos níveis de nucleotídeos intracelulares cíclicos, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), vem sendo investigada como terapia promissora contra alguns tipos de câncer (HIRSH *et al.*, 2004). A regulação dos níveis de cAMP e cGMP é desempenhada por enzimas PDE (BENDER; BEAVO, 2006). A inibição de isoformas de PDE expressas em tecidos específicos se mostrou eficaz no tratamento de diversas enfermidades como disfunção erétil, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (AHMAD *et al.*, 2015).

Diante do exposto, e visto que o papel de PDE7 em tumores sólidos ainda precisa ser melhor esclarecido, o presente trabalho buscou avaliar a inibição da PDE7 utilizando o inibidor competitivo comercialmente disponível exclusivamente para fins de pesquisa, o BRL50481, no carcinoma ovariano. O mesmo foi empregado em monoterapia e em associação com paclitaxel (PTX) e cisplatina (CISP). Ademais, foram analisadas as principais vias de sinalização envolvidas na proliferação celular do CAOV mediada por PDE7. Ainda, investigou-se a participação da proteína claudina-16 (CLDN-16), formadora e mantenedora da integridade das junções ocludens (JO) do tecido epitelial. Logo, a alteração de sua expressão pode culminar com o processo de desdiferenciação do tecido epitelial canceroso, conseqüentemente, facilitando a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e a progressão da doença (RANGEL *et al.*, 2003).

Os dados deste trabalho são promissores e poderão contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão do CAOV, explorando novas possibilidades de estratégias terapêuticas contra a doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CAOVS

O carcinoma ovariano é considerado a maior causa de morte por tumores ginecológicos. Segundo dados da Sociedade Americana do Câncer, para o ano de 2017, são estimados 22.440 novos casos de CAOVS e 14.080 óbitos nos Estados Unidos. Embora ao longo de duas décadas a taxa de incidência de CAOVS tenha diminuído 1% ao ano em mulheres brancas e 0,4% em mulheres negras, o CAOVS ainda configura a quinta causa de óbito entre as mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

No Brasil, dados de 2016 do Instituto Nacional do Câncer mostraram que o CAOVS ocupou a sétima posição dentre os principais tipos de câncer que acometem as mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma. O Espírito Santo apresenta taxa de incidência de 5,78 por 100 mil habitantes, sendo que, considerando apenas Vitória, essa taxa sobe para 9,45 (SANTIAGO; NOVOA, 2016). Estudo epidemiológico conduzido pelo nosso grupo de pesquisa no Espírito Santo mostrou ainda prevalência maior de CAOVS em mulheres com idade acima de 60 anos (PAES *et al.*, 2011).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, publicados em 2000, estima-se um crescimento em torno de 9% da população idosa em 50 anos. Assim, à medida que a população envelhece, aumenta-se o número total de casos dessa neoplasia, o que reflete economicamente nos sistemas de saúde público e privado (MAGALHÃES, 2013). À luz do exposto, em 2010, o CAOVS passou a ser considerado uma doença prioritária no Brasil, sendo aprovado e regulamentado pelo Ministério da Saúde diretrizes diagnósticas e terapêuticas utilizadas no tratamento desta neoplasia.

2.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CAOVS

De acordo com histopatologia, imunohistoquímica e análise genética podemos distinguir, pelo menos, cinco tipos principais de CAOVS: carcinoma seroso de alto grau (70%); endometrióide (10%); células claras (10%); mucinoso (3%); e carcinoma seroso de baixo grau (5%) (LEE *et al.*, 2003). Estes cinco subtipos representam 98% dos carcinomas ovarianos. Os tumores menos comuns compreendem os de células

germinativas malignos, disgerminomas, tumores do saco vitelínico e teratomas imaturos (PRAT, 2014).

Aproximadamente 10% dos casos de CAO V estão associados com alterações genéticas autossomais dominantes hereditárias que levam à predisposição ao câncer (BOYD, 2003; JELOVAC; ARMSTRONG, 2011). As mutações germinativas nos oncogenes do Câncer de Mama 1/2 (*BRCA1/2*) correspondem a 5-15% do total dos casos de CAO V, enquanto que os fatores não genéticos estão relacionados a 1,4% do total de casos (KIGAWA, 2013).

Ademais, o risco de desenvolvimento de CAO V pode estar diretamente associado à maior exposição ao estrogênio, tais como menarca precoce, menopausa tardia e ao uso de terapia hormonal (SALEHI *et al.*, 2008).

O CAO V não é uma doença homogênea, ao contrário, é formado por um grupo de doenças com diferenças morfológicas e etiológicas que compartilham de uma mesma localização anatômica. Evidências moleculares e achados patológicos mostraram que os tumores podem ser derivados de tecidos não ovarianos e os diferentes subtipos histológicos compartilham de determinadas similaridades moleculares (FIGURA 1) (MCCLUGGAGE, 2011; PRAT, 2014; VAUGHAN *et al.*, 2011).

Em relação à origem do CAO V, estudos mostraram que o carcinoma seroso de alto grau pode ter origem tanto na superfície do ovário quanto na tuba de falópio. Embora diferentes estudos tenham mostrado uma relação entre carcinoma seroso de alto grau intra-epitelial tubal (do inglês *STICS*) e os genes *BRCA1/2* mutados (CALLAHAN *et al.*, 2007; PIEK *et al.*, 2001), mesmo em pacientes com mutações em *BRCA1/2*, não existe uma clara correlação entre a origem tubária e o subtipo seroso de alto grau. Assim, as origens multicêntricas como invaginações mesoteliais da superfície do ovário e cistos de inclusão também devem ser consideradas (PRAT, 2014). Já para o carcinoma seroso de baixo grau, acredita-se que as células são derivadas do próprio ovário (BOWTELL, 2010) (FIGURA 1).

Além disso, a maioria dos casos de carcinomas mucinosos ocorre como metástases no ovário e, frequentemente, possui como origem o trato gastrointestinal, incluindo cólon, apêndice ou estômago (LEE & YOUNG, 2003; ZAINO *et al.*, 2011). Por outro

lado, o carcinoma endometrióide e o de células claras podem ser derivados da endometriose. Os tumores benignos e com baixos potenciais de malignidade podem ter origem no ovário, no entanto, as células originárias ainda não são definidas (VAUGHAN *et al.*, 2011) (FIGURA 1).

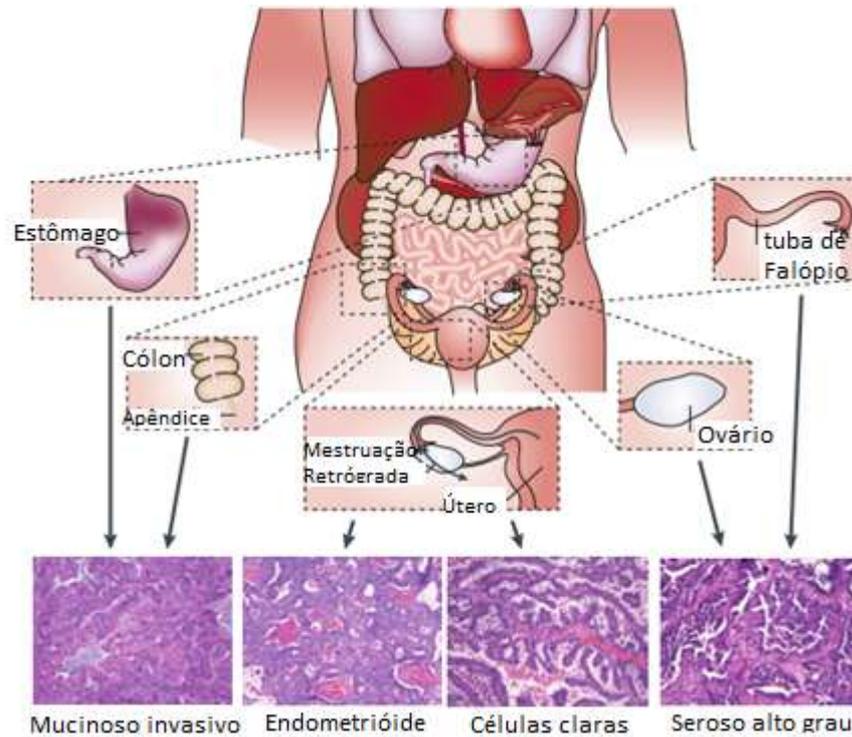


Figura 1: Origem do CAOV

Imagens histológicas cortesia R. Drapkin, Dana-Farber, Cancer Institute, EUA, e C. Crum, Brigham e Women Hospital, EUA. Adaptado VAUGHAN *et al.*, 2011.

KURMAN & SHIH (2016) propuseram um modelo dualístico que classifica os diversos subtipos de CAOV epitelial em dois grandes grupos: i) tumores do tipo I, os quais incluem os carcinomas serosos de baixo grau, endometrióide, células claras, mucinoso, tumores malignos de Brenner e carcinomas seromucinosos; ii) tumores do tipo II, que englobam os tumores carcinoma seroso de alto grau, carcinosarcomas e carcinomas indiferenciados. Os tumores do tipo I e do II apresentam origem tecidual distinta, além de diferenças genéticas, moleculares e morfológicas. Em geral, tumores do tipo I estão associados com alterações moleculares distintas raramente encontradas em tumores do tipo II, como mutações em serina/treonina cinase pertencente à família B-Raf (*BRAF*), oncogene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten (*KRAS*), receptor 2 do fator de crescimento da epiderme humano (*HER2*), gene homólogo à tensina e fosfatase (*PTEN*). Já os tumores do

tipo II apresentam maior homogeneidade molecular e morfológica, são geralmente detectados em estadio avançado (III e IV) e 98% dos casos apresentam mutações na proteína tumoral p53 (*TP53*) (KURMAN, 2013).

Embora 80% das pacientes diagnosticadas com carcinoma seroso de alto grau apresentam resposta inicial satisfatória ao tratamento com cisplatina, 70% das mesmas têm recidiva do tumor. Interessantemente, em torno de 44-48% dessas pacientes apresentam alta resistência aos quimioterápicos etoposídeo e doxorrubicina. No entanto, apenas 14-28% desenvolvem alta resistência aos demais quimioterápicos (cisplatina, carboplatina e paclitaxel), índice muito menor quando comparado às pacientes com carcinoma seroso de baixo grau (SANTILLAN *et al.*, 2007).

2.3 DIAGNÓSTICO DO CAO V

O diagnóstico precoce é crucial para o sucesso do tratamento do carcinoma ovariano. No entanto, a maioria dos casos de CAO V é detectada em estadio avançado (III e IV) quando a doença já se encontra em metástase (MCCLUGGAGE, 2011; SOSLOW, 2008; SHIH & KURMAN, 2004). Estima-se que, no momento do diagnóstico, apenas 15% dos casos de câncer estão confinados ao ovário (GOFF *et al.*, 2000).

O diagnóstico histopatológico reprodutível do tipo tumoral é uma condição primordial para o sucesso do tratamento, pois diferentes subtipos tumorais respondem de forma distinta à quimioterapia. O estadiamento do CAO V segue diretrizes estabelecidas pela FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) que foi revisada em 2012 devido à classificação do CAO V como uma doença heterogênea (PRAT, 2014) (QUADRO 1).

Apesar dos métodos de rastreio para mulheres assintomáticas não serem eficazes, o conhecimento dos sintomas pode ajudar a identificar a doença em fase precoce. Assim, alguns sintomas sugestivos incluem dor pélvica ou abdominal, urgência ou frequência urinária, inchaço e saciedade precoce (GOFF *et al.*, 2007). As mulheres que apresentaram seis destes sintomas mais de doze vezes por mês em um período menor que um ano apresentam sensibilidade de detecção de CAO V de 56,7% para a doença em estadio inicial, e 79,5% em estadio avançado. A especificidade é de

90% para pacientes com mais de 50 anos, e 86,7% para pacientes com menos de 50 anos. Dessa forma, a presença desses sintomas deve ser considerada no diagnóstico diferencial de CAO (JELOVAC; ARMSTRONG, 2011).

Quadro 1: Estadiamento FIGO e Prognóstico de CAO. Adaptado (JELOVAC; ARMSTRONG, 2011).

Estadiamento FIGO	Características	Distribuição (%)	Taxa de sobrevida em 10 anos (%)
I	Doença confinada no ovário ou tuba de falópio	20	73
IA	Tumor limitado em 1 ovário (cápsula intacta) ou tuba de falópio, sem ascites		
IB	Tumor em ambos os ovários (cápsula intacta) ou tuba de falópio, sem ascites		
IC	Estádio IA ou IB adicionado de ascites, cápsula rompida, tumor na superfície do ovário		
II	Tumor com metástase na pélvis	5	45
III	Doença confirmada na cavidade abdominal incluindo superfície do fígado, pélvis, para-aórtica, gânglios linfáticos e intestino	58	21
IIIA	Nódulos linfáticos negativos adicionados de espalhamento microscópico na superfície peritoneal		
IIIB	Nódulos linfáticos negativos, implante peritoneal <2cm		
IIIC	Nódulos linfáticos positivos e/ou implante abdominal >2cm		
IV	Espalhamento para o parênquima do fígado, pulmão, pleura ou outros locais extra-abdominais	17	<5

O diagnóstico de CAOV se inicia com a detecção de uma massa anexial durante exame pélvico, sendo a ultrassonografia o teste de rastreio não invasivo mais utilizado. A recomendação para a cirurgia depende do grau de malignidade da massa pélvica associado a fatores que incluem a idade da paciente, o início da menopausa, o histórico familiar, o nível de CA-125 e a uni- ou bilateralidade do tumor (CANNISTRA, 2004). Embora recomendada clinicamente, a dosagem de CA-125 ainda é questionável, visto que esse marcador pode estar elevado tanto em condições não-malignas como endometriose e em casos de inflamação pélvica, bem como em doenças malignas, incluindo tumores do endométrio e do pâncreas (BAST *et al.*, 1983).

2.4 TRATAMENTO DO CAOV

Conforme discutido anteriormente, devido à inexistência de métodos de detecção eficazes, o CAOV é diagnosticado em estadios iniciais apenas em 25% das pacientes. Na maioria dos casos em que os tumores são detectados em estadios I ou II, a cirurgia é curativa, com taxa de sobrevida de cinco anos em torno de 90% (HENNESSY *et al.*, 2009). Embora a taxa de resposta inicial ao tratamento de primeira escolha com carboplatina e PTX seja superior a 80%, a maioria das pacientes sofre recidiva do tumor e apresentam sobrevida média livre da doença de apenas 18 meses (MODUGNO; EDWARDS, 2012). De fato, o tratamento padrão para pacientes em estadios avançados é citorredução cirúrgica (histerectomia abdominal total, salpingo-ooforectomia bilateral, linfadenectomia pélvica e para-aórtica) seguida da quimioterapia à base de platina/taxano. Mulheres diagnosticadas com CAOV em estadios III ou IV apresentam sobrevida de cinco anos em torno de 10-30% (HENNESSY *et al.*, 2009; PAES *et al.*, 2011).

O agente alquilante cisplatina (CISP) (cis-diaminodicloroplatina(II)) foi introduzido no tratamento para CAOV em 1973 (OMURA *et al.*, 1986). O mecanismo de ação dos derivados de platina consiste na ativação intracelular e posterior ligação covalente com o sulco maior no DNA formando aductos, por meio de ligações intra e intercadeias, induzindo alterações estruturais no DNA. Dessa forma, ocorre a ativação de diversas vias de transdução de sinal como vias de reparo de DNA, ciclo celular e apoptose (KELLAND, 2007).

Em meados de 1990, o tratamento de CAO V foi alterado com a introdução dos taxanos. O PTX é um éster alcalóide complexo que interfere na formação dos microtúbulos durante a mitose resultando em parada do ciclo celular. Estudos mostraram que PTX é ativo no tratamento do CAO V recorrente, incluindo os casos de câncer progressivo durante ou alguns meses após o tratamento à base de CISP (THIGPEN *et al.*, 1994; TRIMBLE *et al.*, 1993). Assim, pacientes que apresentavam resistência à CISP se beneficiam da combinação de carboplatina e PTX no tratamento dessa enfermidade.

Embora o tratamento de primeira escolha apresente taxa de resposta satisfatória, a maioria das pacientes sofre recidiva da doença, e assim, tornam-se candidatas ao tratamento de segunda escolha (RUBIN *et al.*, 1999). Em geral, as pacientes que possuem doença estável ou em progressão durante o tratamento de primeira escolha ou apresentam recidiva um mês após o término do tratamento são classificadas como sendo refratárias à platina (MARKMAN *et al.*, 1991). Essas pacientes são candidatas às novas abordagens experimentais e aos estudos de resistência às drogas e são beneficiadas com a terapia utilizando uma única classe de droga, tais como: topotecano, PTX, etoposídeo oral, doxorubicina lipossomal peguilada, gemcitabina, ifosfamida e hexametilmelamina (KIM *et al.*, 2012).

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

Apesar de o CAO V configurar um dos tumores sólidos mais sensíveis à terapia padrão supracitada, a maioria das pacientes em estadió avançado apresenta recidiva e desenvolve quimiorresistência ao tratamento (JAPAN SOCIETY OF GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 2010). Além disso, as drogas citotóxicas interferem na síntese de DNA, no sistema de reparo e na mitose de forma indiscriminada. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno de quimiorresistência, incluindo a farmacocinética do fármaco, o menor influxo de droga, o aumento da atividade de reparo, o microambiente tumoral e a inativação da droga pela glutatona ou outros agentes anti-oxidantes, (ANDREWS *et al.*, 1988; KIGAWA *et al.*, 1998) (FIGURA 2).

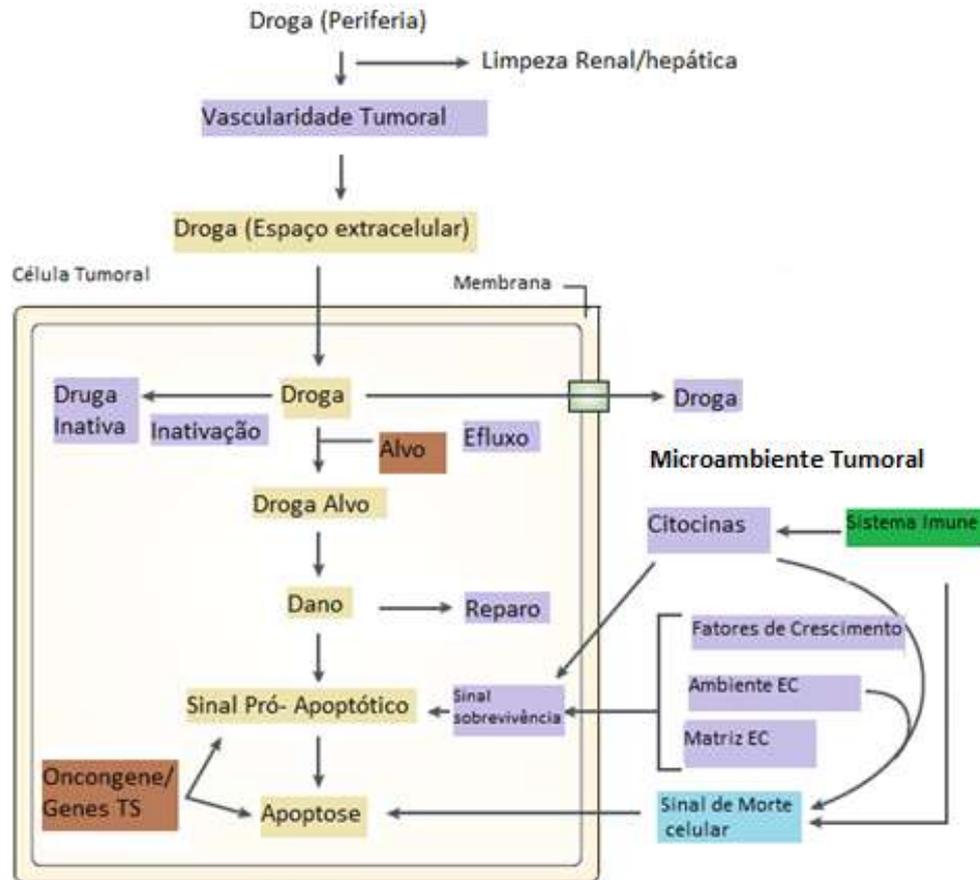


Figura 2: Mecanismos de resistência às drogas.

Caixas em Amarelo: via de ação da droga; Azul: vias de promoção de morte celular; Roxo Claro: vias que medeiam a resistência aos medicamentos; Marrom: vias com efeitos potencialmente pró e anti-citotóxicos. TS: genes supressores tumorais; CE: matriz extracelular. Adaptado de AGARWAL; KAYE, 2003.

Estudo desenvolvido por BOOKMAN et al. (2009), denominado GOG 182-ICON, mostrou que a associação de agentes citotóxicos como gemcitabina, PLD e topotecano à terapia padrão baseada em derivados de platinas e taxanos não alterou a sobrevida global das pacientes. Além disso, os agentes utilizados na terapia de segunda escolha obtiveram uma eficácia de apenas 10 a 30% nos tratamentos e menores taxas de resposta comparado aos agentes de primeira escolha (KIGAWA, 2013; WILLIAMS, 1993).

Ademais, um estudo genético conduzido por MARCHINI e colaboradores (2013) com 23 biópsias de tumores de grau III e IV de pacientes a priori à quimioterapia e, posteriormente, submetidos a uma segunda cirurgia após o tratamento à base de platina, mostrou alteração na expressão dos genes do Receptor do Tipo Toll 4 (TLR4), remodelamento da matriz extracelular e sinalização via TGF- β , todos envolvidos na Transição Epitélio-Mesênquimal (TEM) decorrentes do tratamento à

base de platina.

A TEM é caracterizada pelo aumento da expressão de marcadores mesenquimais (vimentina, trombospondina, N-caderina e vitronectina), aumento da expressão de componentes da matriz extracelular (colágeno IV e fibronectina), diminuição da expressão de marcadores epiteliais (E-caderina e mucina-1) e alteração da localização de fatores transcricionais como β -catenina, repressor transcricional 1 da família Snail (Snail), repressor transcricional 2 da família Snail (SLUG), fator transcricional 1 da família BHLH Twist (TWIST), fator transcricional Sox10 (Sox 10) e o fator nuclear kappa B (NFk-B), bem como a ativação de cinases (ERK1, ERK2 e PI3K/AKT) (TURLEY *et al.*, 2008).

Ainda não está claro se a resistência às múltiplas drogas ocorre devido à presença de subpopulações de células resistentes possivelmente com propriedades de células troncos já existentes na massa tumoral antes do tratamento, ou se é induzida por mutações e modificações epigenéticas causadas pelos quimioterápicos (MARCHINI *et al.*, 2013). Nesse contexto, as células tronco tumorais (CTT) foram definidas como subconjunto de células cancerosas dentro de uma massa tumoral auto-sustentáveis com capacidade exclusiva de se auto-renovarem e promoverem heterogeneidade nas linhagens celulares cancerosas (CLARKE *et al.*, 2006). A presença das mesmas já foi descrita em diversos tipos de tumores sólidos como mama (AL-HAJJ *et al.*, 2003), cérebro (GALLI *et al.*, 2004), cólon (O'BRIEN *et al.*, 2007), próstata (COLLINS *et al.*, 2005) e ovário (BAPAT, 2010).

O papel crítico do microambiente tumoral tem sido gradualmente reconhecido na progressão e metástase do CAOV e pode ser utilizado como potencial biomarcador diagnóstico e alvo terapêutico. A interação do microambiente com as células tumorais fornece força motriz para a invasão dessas células e metástase (LUO, ZHONGYUE *et al.*, 2016).

Outrossim, as citocinas podem auxiliar na progressão tumoral diretamente como fatores de crescimento promovendo proliferação celular e angiogênese, bem como moduladores do sistema imunológico favorecendo o crescimento tumoral pelo bloqueio dos mecanismos celulares utilizados para identificar e destruir o tumor (NASH *et al.*, 1999). Além disso, os sinais exacerbados pelas citocinas favorecem a reprogramação do microambiente tumoral promovendo o crescimento celular

(JONES *et al.*, 2016). A exemplo, a interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica que promove diferenciação de células B e T, induz a produção de reagentes da fase aguda e estimula a hematopoiese. Além disso, esta citocina também pode estimular a proliferação de células tumorais e promover a angiogênese (NILSSON *et al.*, 2005).

Assim, a resistência às drogas é um fenômeno complexo. O atual paradigma discute que a terapia combinada em detrimento ao tratamento com uma única droga é a melhor opção, pois pode prevenir o desenvolvimento de resistência aos fármacos (HEERBOTH *et al.*, 2014; HOUSMAN *et al.*, 2014; SARKAR *et al.*, 2013).

2.6 VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR PI3K/AKT/mTOR E MAPK/ERK

A tumorigênese é o resultado de um desbalanço entre a divisão e crescimento das células e a morte das mesmas. No contexto deste delicado equilíbrio, as vias de sinalização envolvidas no crescimento celular e diferenciação sofrem frequentes modulações (FRESNO VARA *et al.*, 2004). Uma importante via é a PI3K/AKT/mTOR. Esta possui um papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos como angiogênese, proliferação, metabolismo e sobrevivência de numerosos cânceres, incluindo o CAOV (LI; WANG, 2014) e, a inibição desta via pode retardar o crescimento tumoral (KINROSS; MONTGOMERY, KG KLEINSCHMIDT; *et al.*, 2012; TANWAR *et al.*, 2011).

Brevemente, a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (PI3K) é um heterodímero formado por subunidades catalíticas e regulatórias e organizado em classes I, II, e III. Esta enzima fosforila o fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) para gerar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) após ativação dos receptores do tipo tirosina-cinase (SARBASSOV *et al.*, 2006). Em condições fisiológicas, o nível de PIP₃ é estritamente regulado por PTEN, fosfatase que catalisa especificamente a desfosforilação de PIP₃, convertendo PIP₃ em PIP₂, constituindo, assim, um importante mecanismo endógeno de feedback negativo da via (PETRULEA *et al.*, 2015). PIP₃ recruta um subconjunto de proteínas de sinalização, incluindo a proteína cinase-1 dependente de 3-fosfoinositol (PDK1) e proteína cinase B (AKT), o que resulta na fosforilação do resíduo treonina-308 e, conseqüentemente, ativação da via (SARBASSOV *et al.*, 2006) (FIGURA 3).

Em ambas as condições, fisiológicas e patológicas, AKT fosforila o complexo esclerose tuberosa 2 (TSC2) inibindo a atividade de GTPase do complexo TSC1/TSC2. Por conseguinte, mTOR (serina/treonina cinase alvo de rapamicina em mamífero) é ativado pela proteína homóloga ao RAS enriquecida no cérebro (RHEB) permitindo, assim, a propagação de sinal (MANNING; CANTLEY, 2003; MUKOHARA, 2015). mTOR existe na forma de dois complexos protéicos com diferenças estruturais: mTORC1 e mTORC2, sendo que cada um é expresso em diferentes compartimentos subcelulares, o que afeta sua ativação e função (ENGELMAN *et al.* 2006; JACINTO *et al.*, 2004) (FIGURA 3).

No CAOv, alterações moleculares na via PI3K/AKT/mTOR são tipo histológico específico. A exemplo, no carcinoma seroso de alto grau 20% dos casos apresentam amplificações na subunidade catalítica alfa de PI3K (PI3KCA), 15% amplificações em uma das isoformas de AKT e apenas 5% dos casos apresentam deleções em PTEN (BELLACOSA *et al.*, 1995; SHAYESTEH *et al.*, 1999). Já as mutações em PI3K são predominantes nos carcinomas seroso de baixo grau, mucinoso, endometrióide e de células claras (CAMPBELL *et al.*, 2004).

Ademais, estudos mostraram que AKT está freqüentemente hiper-ativo em células de CAOv resistentes à cisplatina por meio da inibição da fosforilação da proteína p53 (FRASER, M; BAI; TSANG, 2008). Por outro lado, LEE *et al.* (2010) demonstraram que a adição de um inibidor de AKT aumentou a apoptose em células de CAOv induzida por platina. Assim, a citotoxicidade mediada por cisplatina afeta a expressão de fatores moleculares incluindo a ativação de p53 e, subsequentemente, a modulação de proteínas da família Bcl-2, incluindo proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax e Bak e proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Mcl-1 (AGARWAL; KAYE, 2003; DAI *et al.*, 2016).

A expressão anormal de AKT ou a sua ativação podem também conferir resistência ao quimioterápico PTX (PAGE *et al.* 2000). Estudos mostraram que a inibição de PI3K aumentou a eficiência do tratamento com o mesmo em modelos *in vivo* e *in vitro* de CAOv (HU, L *et al.*, 2002).

Desse modo, a ativação anormal desta via confere resistência às terapias convencionais, além de ser um fator de pobre prognóstico para muitos tipos de câncer (BARTHOLOMEUSZ; GONZALEZ-ANGULO, 2012; KANDOTH *et al.*, 2013).

Diversos agentes que possuem como alvos componentes da cascata PI3K/AKT/mTOR estão sobre avaliação em estudos clínicos e pré-clínicos. Estes incluem inibidores de PI3K, AKT, inibidores de sítios catalíticos de mTOR e inibidores duplos de PI3K-mTOR (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Ainda, outra importante via é a MAPK. Esta encontra-se envolvida em diversos processos celulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência, a angiogênese, a migração e a regulação do ciclo celular, influenciando a atividade do alvo a jusante ERK (CHANG, L; KARIN, 2001; CHENG *et al.* 2013). A desregulação da via Ras/Raf/MEK/ERK por mutações nos genes que codificam as proteínas da cascata de sinalização pode estar diretamente associada às neoplasias malignas humanas, contribuindo para a proliferação celular anormal, diminuição da apoptose, angiogênese e desenvolvimento da resistência às drogas (CHENG; ZHANG; LI, 2013; DIAZ-PADILLA *et al.*, 2012; MCCUBREY *et al.*, 2012) (FIGURA 3).

A nível molecular, os carcinomas serosos de alto e baixo grau se distinguem pela expressão diferencial de gene resultante das mutações germinativas e somáticas (FARLEY *et al.*, 2013; GERSHENSON *et al.*, 2009). Embora o subtipo seroso de alto grau apresenta alta frequência de mutação em *TP53* (SINGER *et al.*, 2005), o de baixo grau tem alta frequência de mutações que levam à ativação constitutiva da cascata Ras/Raf/MEK/ERK (DIAZ-PADILLA *et al.*, 2012; FARLEY *et al.*, 2013; POHL *et al.*, 2005).

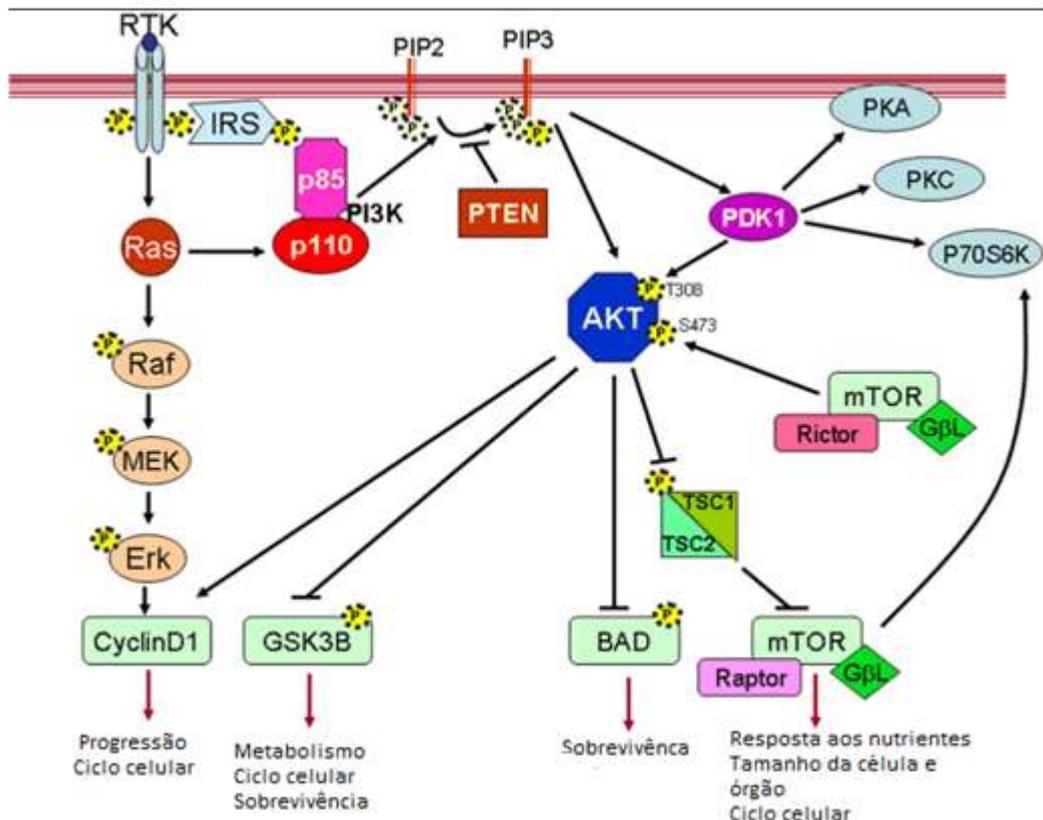


Figura 3: Esquema representando as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK. Adaptado de CARNERO; PARAMIO, 2014.

Existem vários ensaios clínicos com uso de inibidores da via de MAPK/ERK no tratamento para doenças malignas nos ovários. A exemplo, o ensaio clínico de fase III em andamento denominado MILO (Inibidor MEK em CAOVS seroso de baixo grau-NCT01849874) avalia o uso do inibidor MEK162 ou dos quimioterápicos citotóxicos (PTX, doxorrubicina lipossomal ou topotecano) de forma randômica em pacientes diagnosticadas com carcinoma seroso de baixo grau com recidiva ou persistente de origem no ovário, na tuba de falópio ou no peritônio primário (HOU, *et al.*, 2013; NONAKA *et al.*, 2012). Ademais, em linhagens celulares de carcinoma de ovário com e sem mutações em BRAF e KRAS as combinações dos inibidores de MEK com fulvestrante (HOU, *et al.*, 2013), cisplatina (NONAKA *et al.*, 2012) e inibidores da via de PI3K/mTOR (KINROSS *et al.*, 2012) também apresentaram atividade antitumoral.

2.7 JUNÇÕES OCLUDENS

Nos vertebrados, as células epiteliais são unidas por um conjunto de junções intercelulares que consistem de junções GAP, desmossomos, junções aderentes e

junções ocludens (JO) (FARQUHAR; PALADE, 1963). As JO atuam regulando o trânsito de íons e moléculas por meio da via paracelular e o movimento de proteínas e lipídeos entre os domínios apicais e basolaterais da membrana plasmática (KRAUSE *et al.*, 2008).

Dentre as principais proteínas constituintes das JO podemos citar as proteínas transmembranas ocludinas, CLDNs, proteínas de adesão da superfamília das imunoglobulinas como as moléculas de adesão juncionais (JAM) (MATTER; BALDA, 2003) (FIGURA 4A). Estas atuam não apenas como uma barreira paracelular, mas também como uma parte de estrutura complexa associadas às diversas moléculas envolvidas na cascata de sinalização celular como proteínas G, cinases e fosfatases que controlam o crescimento e diferenciação celular (GONZALEZ-MARISCAL *et al.*, 2003).

2.7.1 Claudinas

As proteínas claudinas pertencem a uma família de proteínas integrais de membranas composta de 27 membros (MORIN, 2005). Estruturalmente, apresentam quatro domínios transmembranares e dois *loops* extracelulares, sendo que nas CLDN-3 e CLDN-4 o segundo *loop* atua como receptor da enterotoxina *Clostridium perfringens* (FUJITA *et al.*, 2000) (FIGURA 4B).

As células tumorais frequentemente exibem JO com funções anormais, bem como diminuição na diferenciação e na polaridade celular que podem contribuir para metástase (MARTIN; JIANG, 2001; WEINSTEIN *et al.*, 1976). Além disso, a perda de integridade das JO pode ser particularmente importante, pois permite a difusão de nutrientes e outros fatores necessários para a sobrevivência e o crescimento das células tumorais (MULLIN, 1997). Frequentemente são observadas alterações no padrão de expressão das CLDNs em diversas neoplasias, incluindo o carcinoma colorretal, mama, ovário, pâncreas, pulmão e próstata (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; GUO *et al.*, 2012; HOGGARD *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2009; RANGEL *et al.*, 2003). Apesar de diversos estudos mostrarem que o perfil de expressão das CLDNs em diferentes tumores é dependente do grau de estadiamento e do tipo tumoral, o papel de CLDNs na progressão tumoral ainda é controverso (TURKSEN; TROY, 2011).

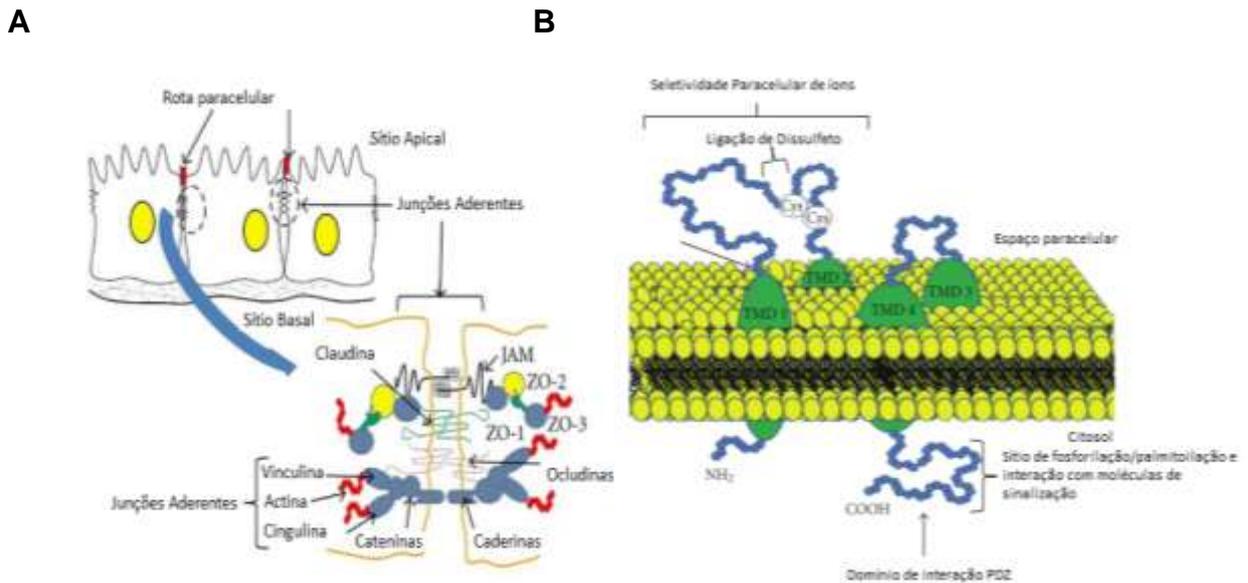


Figura 4: Junções ocludens e as proteínas claudinas.

(A) Representação esquemática da localização das JO entre as células epiteliais e o transporte paracelular. (B) CLDNs são proteínas transmembranas com domínios 1 a 4 (TMD-1, TMD-2, TMD-3 e TMD-4) e loops extracelulares. Terminal -COOH das proteínas CLDNs contém domínio de ligação PDZ os quais sofrem modificações pós-transcricionais. Adaptado de SINGH *et al.*, 2010.

RANGEL e colaboradores (2003a) identificaram pela metodologia de SAGE cinco alvos especificamente expressos no CAO, dentre eles o gene que codifica CLDN-16. A superexpressão de CLDN-16 foi confirmada por meio de ensaios de *Northern Blot* e PCR em tempo real. Essa proteína é encontrada amplamente expressa em células epiteliais de rim regulando o transporte paracelular de íons de magnésio na alça ascendente Henle. Mutações no gene CLDN-16 causam desordens autossômicas recessivas hereditárias denominadas hipomagnesemia familiar, hipercalcúria e nefrocalcinose que podem resultar em um aumento na resistência na JOs com concomitante diminuição na permeabilidade iônica epitelial (SATO; ROMERO, 2002).

As JO são estruturas dinâmicas reguladas pela ligação cruzada com diversas vias de sinalização, incluindo proteína cinase A (PKA), proteínas G monoméricas e heterotriméricas e isotipos da proteína cinase C (PKC), cujos mecanismos variam de acordo com o ambiente celular (MATTER; BALDA, 2003). IKARI e colaboradores (2008) mostraram que a localização da JOs e o transporte de Mg^{+2} de CLDN-16 são regulados pela fosforilação dependente da via cAMP/PKA em células de Madin-Darby de rim canino as quais apresentaram expressão estável de CLDN-16. Além disso, a modulação da expressão de CLDN-1 pela via de PKC foi observada em câncer de cólon e em câncer pancreático (JIAN *et al.*, 2015; KYUNO *et al.*, 2013)

Dessa forma, estudos são necessários para elucidação dos diversos mecanismos de ação envolvidos na modulação da expressão de CLDNs potencializando o uso de inibidores de vias de sinalização como agentes terapêuticos contra o câncer.

2.8 FOSFODIESTERASES E O CÂNCER

Os sistemas de sinalização por cAMP e de cGMP regulam grande número de processos fisiológicos, incluindo transdução, proliferação celular e diferenciação, expressão gênica, inflamação e apoptose, dentre outros (CONTI; BEAVO, 2007). O mensageiro celular cAMP é sintetizado pela enzima adenilato ciclase e ativa diversos efetores como PKA, canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos, proteínas trocadoras de nucleotídeos de guanina ativadas por cAMP (fatores de troca diretamente ativadas por cAMP EPAC1 e EPAC2) e enzimas da família das fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico (PDE). Estas contêm sítios de ligação alostéricos e catalíticos aos nucleotídeos cíclicos com função celular de hidrolizar a ligação 3',5' fosfodiester do cAMP para 5'-AMP (CONTI; BEAVO, 2007; MAURICE *et al.*, 2014) (FIGURA 5).

As enzimas PDE são formadas por onze superfamílias de genes (*PDE1* a *PDE11*) estruturalmente relacionados mas que diferem em suas estruturas primárias, funções celulares, afinidades pelos nucleotídeos cAMP e cGMP, propriedades catalíticas, mecanismos de regulação e respostas à ativadores, inibidores e efetores. Estas exibem organização estrutural comum com regiões reguladoras amino-terminais importantes para localização celular, bem como para resposta às modificações pós-traducionais específicas e às moléculas reguladoras e um núcleo catalítico carboxi-terminal conservado (CONTI; BEAVO, 2007; KERAVIS; LUGNIER, 2012) (FIGURA 5).

Apesar de não existirem domínios de regulação conhecidos na região amino-terminal, como descrito para outras famílias, são conhecidos pseudossítios de fosforilação que podem se ligar e inibir a atividade de PKA (BENDER; BEAVO, 2006). Em humanos, são descritos três variantes de *splicing*, PDE7-A1, PDE7-A2 e PDE7-A3, que diferem nas regiões N e C-terminais (HAN *et al.*, 1997) (FIGURA 6).

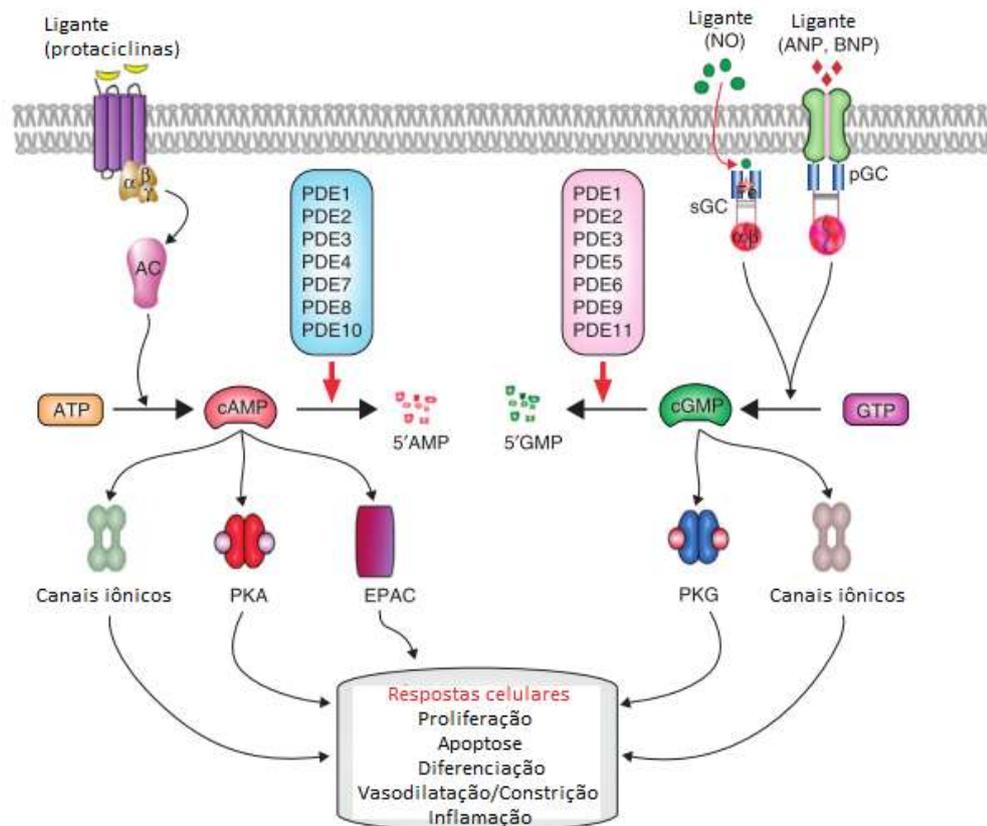


Figura 5: Sinalização das fosfodiesterases de nucleotídeo cíclico (PDE).

As vias de síntese e regulação envolvidas nos efeitos de cAMP e cGMP endógenos. PDE catalisam a hidrólise de cAMP e cGMP e, assim, regulam a amplitude e a duração dos mecanismos de sinalização celular mediados por cAMP e cGMP. AC: Adenilato ciclase; ANP: Peptídeo Natriurético atrial; BNP: Peptídeo Natriurético tipo-B; EPAC: proteína de troca ativado por cAMP; NO: óxido nítrico; pGC: guanilil ciclase particulado; PKA: Proteína Cinase A; PKG: Proteína Cinase G; sGC: guanilil ciclase solúvel. Adaptado de (SAVAI *et al.* 2010)

PDE7-A1 é encontrada no citosol das células e expressa em diversos tecidos, incluindo músculo, baço, cérebro, pulmão, timo e em várias populações de linfócitos (HAN *et al.*, 1997; LUGNIER, 2005), enquanto PDE7-A2 é geralmente associada à fração particulada e abundantemente encontrada no tecido cardíaco (HAN *et al.*, 1997). As isoformas PDE7-A1 e PDE7-A3 são encontradas em uma ampla variedade de células imunes e, assim, alvos para tratamento anti-inflamatório. O

aumento do nível intracelular de cAMP por inibidores seletivos de PDE7 regula negativamente a resposta inflamatória e previne a progressão da inflamação aguda para crônica (ALLISON, 2000; ESSAYAN, 1999; GIEMBYCZ; NEWTON, 2011; SMITH *et al.*, 2004).

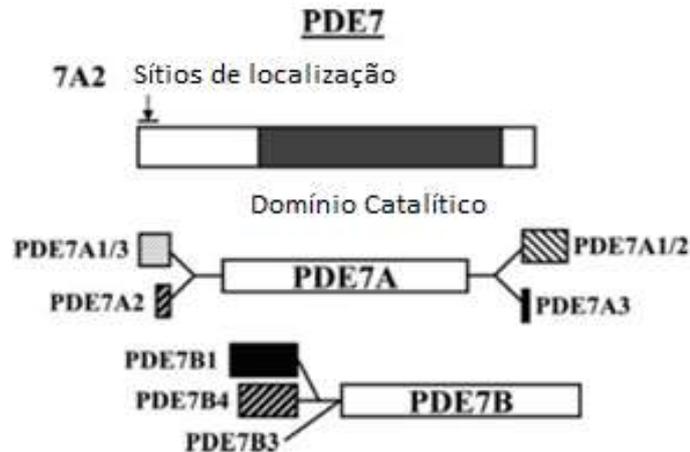


Figura 6: Família PDE7 é composta por duas isoformas PDE7-A e PDE7-B. Em humanos, PDE7-A sofre *splicing* alternativo originando variantes PDE7-A1, PDE7-A2 e PDE7-A3. Adaptado de BENDER; BEAVO, 2006.

O impacto funcional e a utilidade terapêutica da inibição da hidrólise de nucleotídeos cíclicos catalisadas por PDEs têm sido investigados. Estudos mostraram que PDEs podem regular os níveis dos nucleotídeos cíclicos pela integração em complexos regulatórios multi-protéicos de sinalização molecular denominados signalossomos. Além disso, a desregulação desses complexos de sinalização por mecanismos genéticos, epigenéticos e pelo ambiente celular está associado a diversas doenças como asma, inflamação, disfunção erétil e arritmia cardíaca (HOUSLAY *et al.*, 2007; KRITZER *et al.*, 2012).

Interessantemente, estudo conduzido por YAMAMOTO *et al.* (2015) mostrou maior expressão de PDE7-A em amostras de carcinoma endometrióide e o silenciamento dessa proteína inibiu significativamente a migração celular e a invasão. Os pesquisadores ainda mostraram que PDE7-A é um alvo regulado por miR-1 e miR-133a, que se encontra com expressão reduzida nesse tipo tumoral, contribuindo para a oncogênese e a formação de metástase. Além disso, estudos conduzidos por LIN *et al.* (2013) revelaram maior expressão de PDE4-D em onze diferentes amostras de tumores primários quando comparado com tecidos não-transformados.

Deleção de PDE4-D endógeno com três shRNAs independentes promoveu apoptose e inibição do crescimento em múltiplos tipos de câncer, incluindo mama, pulmão, ovário e melanoma, porém as células retomaram o crescimento quando a expressão de PDE4-D foi restabelecida.

2.8.1 Inibidor seletivo de PDE7 BRL50481

Os nossos estudos foram conduzidos utilizando o inibidor competitivo de PDE7 comercialmente disponível exclusivamente para fins de pesquisa denominado BRL50481 (*N,N*,2-Trimetil-5-nitro-benzenosulfonamida) obtido da empresa TOCRIS® (FIGURA 7).

Os primeiros ensaios utilizando esse inibidor foi conduzido por SMITH et al. (2004) em linhagens celulares de linfócitos CD8⁺, monócitos e macrófagos pulmonares. O inibidor apresentou um efeito modesto nas células pró-inflamatórias, por outro lado, mostrou ação aditiva com outras drogas que elevam a concentração de cAMP, especialmente quando a enzima PDE7-A1 encontrava-se superexpressa.

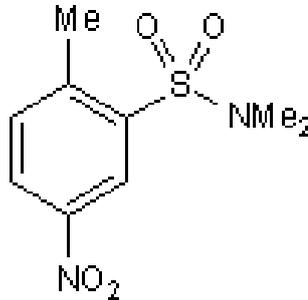


Figura 7: Estrutura molecular do composto BRL50481.

Dessa forma, o trabalho introduziu uma molécula inédita com potencial de tratamento do CAOv, a fosfodiesterase 7 (PDE7). Para tanto, avaliou-se os efeitos da inibição da PDE7 na viabilidade celular metabólica, apoptose, autofagia, migração, modulação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK/AKT e expressão gênica de importantes citocinas inflamatórias utilizando como modelo linhagens celulares de carcinoma ovariano.

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho investigou o papel e os possíveis mecanismos de ação do novo alvo em potencial PDE7 no carcinoma ovariano.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fosfodiesterase 7:

- Validar o resultado de RNA-seq por meio da análise da expressão de PDE7-A em linhagens celulares da tuba de falópio, da superfície ovariana normal e em linhagens de CAOv;
- Analisar as principais vias canônicas moduladas a partir dos dados de RNA-seq;
- Em resposta ao tratamento com BRL50481 em monoterapia e em associação aos quimioterápicos padrão nas linhagens de CAOv A2780 e OVCAR3, temos como objetivos específicos avaliar o papel da PDE7 na :

- Viabilidade celular metabólica;
- Regulação das etapas do ciclo celular;
- Apoptose;
- Expressão gênica das moléculas IL1- α , IL1- β , IL-6, IL-8, GP130 e CXCL-2;
- Produção das citocinas IL-6 e IL-1- β ;
- Plasticidade epitelial e na aquisição do fenótipo de CTT;
- Modulação das vias PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, autofagia e apoptose;
- Migração celular;
- Formação de colônia.

-Claudina-16:

- Avaliar a modulação das vias de PKA, PKC e PI3K/AKT/mTOR na expressão de CLDN-16;

- Avaliar a expressão de CLDN-16 em plataformas de *tissue array* construída em nosso laboratório.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 VALIDAÇÃO DO RNA-seq POR qPCR E IMUNOBLOT

O estudo prévio do transcriptoma (RNA-Seq) utilizando amostras de pacientes com carcinoma seroso de alto grau e tuba de falópio foi desenvolvido no *Molecular Genetics Laboratory of Female Reproductive Cancer*, na Johns Hopkins University, sob orientação do Dr. Ie-Ming Shih. A análise do transcriptoma foi realizada pelo pesquisador-colaborador Ren-Chin Wu. As ferramentas de bioinformática utilizadas foram previamente discutidas e estão descritas no pipeline a seguir: RNA-Seq (Reads) → TOPHAT (alinhamento das reads utilizando os formatos SAM/BAM → Cufflink (montagem dos transcritos) → Cuffdiff (algoritmo que estima a expressão diferencial dos transcritos).

Inicialmente, os dados obtidos foram validados pela técnica PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com as amostras das tubas de falópio e carcinoma de ovário seroso de alto utilizadas no estudo de RNA-seq. Para tanto, foram desenhados primers utilizando o programa qPrimerDepot para nove genes dentre os vinte primeiros genes diferencialmente expressos. Dentre os genes com expressão diferencial e que apresentaram $p < 0,01$, destacou-se a enzima PDE7-A. Assim, a maior expressão do gene *PDE7-A* em amostras de carcinoma ovariano seroso de alto grau quando comparação à tuba de falópio foi confirmado tanto por sequenciamento do transcriptoma quanto por qPCR (APÊNDICE A).

Ademais, os resultados do sequenciamento de RNA foram validados por qPCR no qual foi amplificado o gene *PDE7-A* nas linhagens celulares de CAOv, a saber: OVCAR3, OVCAR4, OVCAR5, OVCAR8, OVCAR249, SKOV3, EOF21, TKMN, CaOV3 e MPSC1, ES-2 e OVTOKO; na linhagem derivada da tuba de falópio FT 2821 e em quatro linhagens derivadas da superfície normal do ovário OSE4, OSE7, OSE10 e IOSE 80 pc. RNA total das amostras foi extraído utilizando o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop Espectrophotometer ND-1000(Nanodrop®).

O cDNA foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA previamente extraído utilizado o kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). O qPCR foi realizado em equipamento CFX96

(Bio-Rad), com o sistema de detecção SYBR Green I (Invitrogen). As sequências do iniciadores utilizados estão descritas na TABELA 1. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada usando o método comparativo $\Delta\Delta CT$. Como gene de referência foi utilizado o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

A expressão de PDE7-A (HPA027340-Sigma®) também foi analisada nas amostras acima citadas pela técnica de *imunoblot*.

Tabela 1: Iniciadores usados na validação do RNA-seq por qPCR.

Gene	Iniciadores	Sequência (5' → 3')
PDE7-A	Senso	TCCTTG CAGAGACAGACACTTC
	Anti-senso	CCGAGCAGGATTTGAATCAG
GAPDH	Senso	CAGCCTCAAGATCATCAGCA
	Anti-senso	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT

4.2 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Nesse projeto foram utilizadas as linhagens celulares de CAO V A2780 (Sigma) e OVCAR3 (Banco de Células da UFRJ). Todas as linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 0,2% de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (Vitrocell), 1% de solução estabilizada de Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), 1% Solução Anfotericina B (Sigma) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

As linhagens utilizadas no estudos apresentam diferenciação quanto à classificação histológica e ao grau de resistência aos quimioterápicos descritos no QUADRO 2. Conforme observado no referido quadro a linhagem OVCAR3 é pan resistente, enquanto que as células da linhagem A2780 não receberam algum tratamento a priori ao isolamento.

Quadro 2: Descrição das características das linhagens celulares de CAO V. Adaptado de STORDAL *et al.*, 2013.

Linhagem celular	Origem histológica	Isolada de	Tratamento recebido antes do isolamento
A2780	Desconhecida	Tumor primário	Nenhum
OVCAR3	Seroso alto grau	Ascites	CIS, DOX, CYC

CIS: cisplatina, DOX: Doxorubicina, CYC: ciclofosfamida

4.3 ENSAIO DA VIABILIDADE METABÓLICA CELULAR

Para cálculo da IC_{50} , concentração de droga que inibe 50% do crescimento das células, foi utilizado o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma) (RISS *et al.*, 2013). Brevemente, células de CAO V foram semeadas em placas de 96 poços nas densidades 2×10^4 ou 1×10^5 células/mL e incubadas por 24 h nas condições padrão de cultivo descritas no item 4.2. Após a adesão celular, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com os agentes quimioterápicos CISP, PTX e o inibidor seletivo de PDE7 BRL50481 (TOCRIS), em mono e politerapia, em um gradiente de concentração que variou de acordo com a droga e a linhagem celular utilizadas (TABELA 2). Após os tempos de tratamentos de 24h e 48h, os ensaios foram incubados com solução de MTT (concentração final 0,5 mg/mL) por 4h. Os cristais de tetrazólio formados foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO (P.A.) e a densidade óptica avaliada em 540 nm. Como controle negativo, utilizou-se o excipiente (PBS ou DMSO 2%) em volume igual ao volume de droga utilizado. Os experimentos foram realizados em triplicata e utilizando três réplicas biológicas. Para o cálculo da IC_{50} utilizou-se o software GraphPadPrism versão 5.0.

Tabela 2: Concentrações dos quimioterápicos utilizados de acordo com a linhagem celular de CAO V e o tempo de tratamento para o cálculo da IC_{50} .

Linhagem celular	Quimioterápico	Faixa de concentração do quimioterápico (μ M)
A2780	BRL50481	400 a 12,5 (diluição 1:2)
	Cisplatina	100 a 3,125 (diluição 1:2)- 24h de tratamento
		100 a 0,001 (diluição 1:10) - 48h tratamento
	Paclitaxel	10 a 0,0001 (diluição 1:10) - 24h de tratamento
10 a 0,000001 (diluição 1:10) - 48h tratamento		
OVCAR3	BRL50481	400 a 12,5 (diluição 1:2) - 24 e 48h de tratamento
	Cisplatina	200 a 1,56 (diluição 1:2) - 24h de tratamento
		100 a 1,56 (diluição 1:2) - 48h tratamento
	Paclitaxel	50 a 0,390 (diluição 1:2) - 24h de tratamento
10 a 0,078 (diluição 1:2) - 48h tratamento		

4.4 CICLO CELULAR

O efeito da inibição da PDE utilizando o inibidor seletivo BRL50481 em monoterapia e em associação ao PTX foi avaliado nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo. As condições experimentais estão descritas na TABELA 3. Células das linhagens celulares A2780 e OVCAR3 foram semeadas na densidade de $0,8 \times 10^6$ cel/mL em placas de seis poços e, após o período de adesão celular, foram tratadas com BRL50481 e PTX em monoterapia e politerapia. Após 24h de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 3 min a 3500 g e o pellet lavado 2 vezes com PBS gelado. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em tampão de permeabilização (Tris-HCl 3,4 mM, pH 7,6, NaCl 10 mM, NP40 0,1% (v/v), RNase 700 U/L e PI 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e as amostras foram incubadas por 15 minutos no gelo, protegidas da luz. A leitura foi realizada no citômetro BD Accuri® C6 FlowCytometer utilizando o canal FL-2 (585nm). Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3. Todos os experimentos foram realizados utilizando duas réplicas biológicas.

Tabela 3: Condições experimentais utilizadas nos experimentos de ciclo celular nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Linhagem celular	Condições Experimentais
A2780	Controle (DMSO)
	BRL50481 200 µM
	PTX 0,01 µM
	PTX 0,53 µM
	BRL50481 200 µM + PTX 0,01 µM
	BRL50481 200 µM + PTX 0,53 µM
OVCAR3	Controle (DMSO)
	BRL50481 400 µM
	PTX 3,56 µM
	PTX 12,5 µM
	BRL50481 400 µM + PTX 3,56 µM
	BRL50481 400 µM + PTX 12,5 µM

4.5 ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR ANEXINA V/IODETO DE PROPÍDEO

O ensaio de detecção de apoptose por anexina V/Iodeto de propídeo (IP) foi utilizado para determinar a porcentagem de apoptose induzida pelos tratamentos realizados. A anexina V faz parte de uma família de proteínas que possuem

capacidade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática, em um processo dependente de cálcio. Durante a apoptose ocorrem várias alterações celulares dentre elas a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. A anexina V não é capaz de penetrar na membrana plasmática de células viáveis, havendo a marcação apenas naquelas que apresentarem exposição da FS. Na análise dessa marcação pela citometria de fluxo, a anexina é então conjugada à um fluorocromo (FITC). E para diferenciar as células vivas das células em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose utilizou-se um intercalante de DNA denominado iodeto de propídeo (IP). Desta forma, células vivas não serão marcadas nem por anexina V nem por IP; células em apoptose inicial apresentam marcação positiva para anexina V e negativa para IP; células em apoptose tardia são positivas tanto para anexina V quanto para IP; e células em necrose apresentam marcação positiva somente para IP.

Brevemente, as células das linhagens A2780 e OVCAR3 foram semeadas na densidade de $0,8 \times 10^6$ cel/mL em placas de seis poços e, após o período de adesão celular foram tratadas com BRL50481 e PTX em monoterapia e politerapia. As condições experimentais estão descritas na TABELA 4. Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi coletado e as células tripsinadas. Realizou-se a inativação do meio com o sobrenadante coletado e centrifugou-se as amostras por 5 minutos a 450 g a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas com o tampão de ligação (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), centrifugadas por 5 minutos a 450 g a temperatura ambiente e incubadas por 15 minutos, protegidas da luz, com 100µL de tampão de ligação adicionado de 5 µL de anexina V (BD Biosciences, Califórnia, EUA), exceto os controles. No momento da leitura adicionou-se 5 µL de PI (1 mg/mL). A leitura foi efetuada no citômetro BD Accuri® C6 Flow Cytometer utilizando o canal FL-1 (530 nm) para a anexina V-FITC e o FL-2 (585 nm) para o PI. Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3. Todos os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas.

Tabela 4: Condições experimentais utilizadas nos ensaios e ANEXINA/IP nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Linhagem celular	Condições Experimentais
A2780	Controle (DMSO)
	BRL50481 200 μ M
	PTX 0,53 μ M
	PTX 1×10^{-7} nM
	BRL50481 200 μ M + PTX 0,53 μ M
OVCAR3	Controle (DMSO)
	BRL50481 400 μ M
	PTX 12,5 μ M
	PTX 5×10^{-4} nM
	BRL50481 400 μ M + PTX 12,5 μ M

4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)

O RNA total das linhagens celulares foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen™). Brevemente, as células das linhagens A2780 e OVCAR3 foram semeadas na concentração de $0,8 \times 10^6$ cel/mL e, após 24h de aderência, foram tratadas com BRL50481 e PTX nas condições descritas na TABELA 5. Após 24h de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS gelado. Em cada poço foi adicionado 600 μ L de TRIZOL e com auxílio de um mini-rodo as células foram removidas da placa e transferidas para um tubo eppendorf. Em seguida, as amostras foram incubadas com TRIZOL a temperatura ambiente por 5 min. Após a adição de 200 μ L de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas vigorosamente por 15 seg e incubadas novamente a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 17900 g a 4 °C por 15 min e as fases aquosas cuidadosamente transferidas para novo tubo contendo igual volume de isopropanol 95%. As amostras foram então incubadas a temperatura ambiente por 5 min e novamente centrifugadas a 17900 g por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 95% e novamente centrifugado. O RNA foi ressuspendido em água DEPC. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®).

Para a síntese da fita de DNA complementar utilizou-se o kit SuperScript II RT (Invitrogen). Os níveis relativos de expressão dos transcritos foram avaliados utilizando o sistema Applied Biosystems® 7500 fast e quantificados pela intensidade

da fluorescência de SYBR® green I (Ludwing Biotec). Os primers utilizados nesse estudo estão descritos na TABELA 6. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada usando o método comparativo $\Delta\Delta CT$ utilizando como gene de referência GAPDH para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em duplicata mecânica. Para cada ensaio foi utilizado três réplicas biológicas.

Tabela 5: Condições experimentais utilizadas nas análises de expressão gênica por de qPCR.

Linhagem celular	Condições Experimentais
A2780	Controle (DMSO)
	BRL50481 200 μ M
	PTX 1×10^{-7} nM
	Pré-tratamento BRL50481 200 μ M + BRL50481 200 μ M + PTX 1×10^{-7} nM
OVCAR3	Controle (DMSO)
	BRL50481 400 μ M
	PTX 5×10^{-4} nM
	Pré-tratamento BRL50481 400 μ M + BRL50481 400 μ M + PTX 5×10^{-4} nM

Tabela 6: Primers utilizados na análise da expressão gênica por de qPCR.

Gene	Iniciadores	Sequência (5' → 3')
GAPDH	Senso	CAGCCTCAAGATCATCAGCA
	Anti-senso	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
IL1-α	Senso	CATCCTCCACAATAGCAGACAG
	Anti-senso	GAGTTTCCTGGCTATGGGATAG
IL1-β	Senso	CAAAGGCCGCCAGGATATAA
	Anti-senso	CTAGGGATTGAGTCCACATTCAG
IL-6	Senso	CATTTGTGGTTGGGTCAGG
	Anti-senso	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
IL-8	Senso	CTTGGCAGCCTTCCTGATTT
	Anti-senso	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
CXCL-2	Senso	AAAAGGGGTTTCGCCGTTCTC
	Anti-senso	AGTGTGGCTATGACTTCGGT
GP130	Senso	TGCCTCCAGAAAAACCTAAAAA
	Anti-senso	TTTGTCTCCAAGTGTGTTTCC
NANOG	Senso	GCCCTGCACCGTCACCC
	Anti-senso	ACCAGGTCTTCACCTGTTTGT
OCT4	Senso	GCCCTGCACCGTCACCC
	Anti-senso	GCTTGGCAAATTGCATCGAGT

4.7 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE CELULAR

A dosagem de IL-6 e IL-1 β , importantes citocinas pró-inflamatórias envolvidas na progressão do CAO, no sobrenadante das culturas celulares de A2780 e OVCAR3 foi realizada pelo método indireto de ELISA. Para tanto, as células foram tratadas conforme descrito na TABELA 5 do item 4.6 e os sobrenadantes coletados e armazenados a -20 °C para posterior utilização. Os ensaios foram realizados em triplicata mecânica e biológica conforme os protocolos descritos pelos fabricantes. A concentração de citocinas no sobrenadante da cultura celular foi calculada por meio da equação de regressão linear construída a partir da curva padrão para cada citocina. O anticorpo de captura e o padrão da IL-1 β foram adquiridos da empresa eBioscience. Já para IL-6, foram utilizados os da empresa PREPROTECH INC. Este experimento foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro em parceria com a Profa. Dra. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco.

4.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As células das linhagens de CAO foram plaqueadas na densidade de $0,4 \times 10^6$ células/mL em placas de 12 poços em meio RPMI suplementado sob as condições de cultivo padrão citados no item 4.2. Após 24 h de aderência, as células foram incubadas com BRL50481 em monoterapia e em combinação com PTX, em diferentes tempos de tratamento (TABELAS 7 e 8). Para extração de proteínas, as células primeiramente foram lavadas com PBS para remoção do excesso de meio de cultivo e removidas com auxílio de um mini-rodó e tampão de extração RIPA (Tris-HCL pH 7,4 50 mM, NaCl 150mM, 1% Triton 100X, 0,5% Deoxicolato de sódio e SDS 0,1%) adicionado de inibidores de fosfatase e proteases (SIGMA) (CAO, FENG *et al.*, 2005). As amostras foram incubadas por 30 min em gelo e, em seguida, centrifugadas a 9000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante correspondente a proteínas totais foi armazenado a -80 °C para posterior utilização. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (SIGMA) (BRADFORD, 1976), em triplicata. A curva padrão foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4 e 8 e 16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em microplaca de 96 poços. Para o ensaio foram adicionados em cada poço, 20 μL da proteína e água e 180 μL do Reagente de Bradford. A placa foi mantida em temperatura ambiente por

10 min e a leitura realizada em Leitor de Elisa (Bio-Rad) em absorbância 595 nm.

Tabela 7: Condições experimentais utilizadas na análise da expressão protéica.

Linhagem celular	Condições Experimentais
A2780	Controle (DMSO) - 48h de tratamento
	BRL50481 200 μ M- 6, 24 e 48h de tratamento
	PTX 0,53 μ M- 24h de tratamento
	PTX 1×10^{-7} nM- 24h de tratamento
	BRL50481 200 μ M + PTX 0,53 μ M- 24h de tratamento
	Pré-tratamento BRL50481 200 μ M- 24 de tratamento +
	BRL50481 200 μ M + PTX 1×10^{-7} nM- 24 de tratamento
OVCAR3	Controle (DMSO)- 48h de tratamento
	BRL50481 400 μ M-6, 24 e 48h de tratamento
	PTX 12,5 μ M- 24h de tratamento
	PTX 5×10^{-4} nM (24h)- 24h de tratamento
	BRL50481 400 μ M + PTX 12,5 μ M- 24h de tratamento
	Pré-tratamento BRL50481 400 μ M- 24h de tratamento +
	BRL50481 400 μ M + PTX 5×10^{-4} nM- 24h de tratamento

Tabela 8: Condições experimentais utilizadas nos experimentos de análise da expressão da proteína CLDN-16 nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Vias de sinalização	Condições Experimentais	Tempos de tratamento
PKA	Inibidor iPKA ₅₋₂₄ (10^{-7} M)	6 e 24h
PKC	Ativador- PMA (200 nM)	6 e 24h
	Inibidor- Calfostina C (5×10^{-7} M)	
PI3K/AKT/mTOR	Inibidor -LY290042 (20 μ M)	6 e 24h

Siglas:iPKA₅₋₂₄ -Inibidor amida da proteína cinase A dependente cAMP (5-24)

PMA- forbol 12-miristato 13-acetato

4.9 IMUNOBLOT

A expressão de proteínas envolvidas nas vias sinalização de PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK, proteínas relacionadas a morte celular por apoptose e autofagia, bem como a expressão de CLDN-16 foram analisadas nas linhagens de CAO V A2780 e OVCAR3 tratadas com inibidor seletivo de PDE7 em monoterapia e politerapia com o quimioterápico PTX pela técnica de *immunoblot*.

O perfil das proteínas totais (30 μ g) foi resolvido por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 10% (LAEMMLI, 1970). Posteriormente, as proteínas foram

transferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot[®] Bio-Rad) a 200 mA por 2h, no gelo, em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol 20%) utilizando o sistema de transferência BIORAD. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS-T (Tris-HCl 100 mM; NaCl 1,5 M pH 7,5 e 0,05% Tween 20) acrescido de leite em pó desnatado 5% por 1h a temperatura ambiente e, posteriormente lavadas 3 vezes com TBS-T por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (TABELA 9) a 4 °C por 16h e, posteriormente, lavadas três vezes com TBS-T por 15 minutos. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados anti-IgG produzidos em coelho ou camundongo marcados com peroxidase (GE) (1:5000) por 2h em temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram diluídos em TBS-T acrescido de leite em pó desnatado 0,5%.

As membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham), de acordo com o protocolo do fabricante. As membranas foram normalizadas utilizando os anticorpos monoclonais primários anti- α -actina ou anti-GAPDH produzidos em coelho e o anticorpo secundário conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (GE). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageLab (Biorad).

Tabela 9: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise da expressão protéica.

Anticorpos	Fabricante	Diluição
AKT	Cell Signaling	1:250
Fosfo-AKT	Cell Signaling	1:250
ERK	Cell Signaling	1:250
Fosfo-ERK	Cell Signaling	1:250
GSKβ	Cell Signaling	1:500
Fosfo- GSKβ^{SER9}	Cell Signaling	1:500
Beclina	Sigma	1:500
Bax	BD	1:500
Claudina-16	Abcam	1:700
GAPDH	Cell Signaling	1:5000
Actina	Sigma	1:5000

4.10 MIGRAÇÃO CELULAR

As células da linhagem de CAO V A2780 e OVCAR3 foram semeadas em placas de

24 poços na concentração $0,4 \times 10^6$ cel/mL até atingirem 80-90% confluência. Após 24h de aderência, as células foram tratadas com Mitomicina C ($5 \mu\text{g/mL}$) (Sigma), um agente inibidor da proliferação celular, e incubadas a 37°C por 2h a 5% de CO_2 . O arranhão no centro de cada poço foi realizado com auxílio de uma ponteira de $10 \mu\text{L}$. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS e as células tratadas com DMSO (Controle), BRL50481 na concentração da IC_{50} e paclitaxel nas concentrações 1×10^{-7} nM e 5×10^{-4} nM. Os ensaios foram acompanhados nos tempos 0, 24, 48 e 72h após o tratamento. Para cada condição foram avaliados dois arranhões, sendo que em cada um deles eram realizadas medidas em dois pontos definidos arbitrariamente. A cicatrização relativa em cada tempo foi calculada tendo como referência o tempo zero. Os experimentos foram realizados em triplicata

4.11 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para o ensaio de formação de colônia foi utilizado o protocolo adaptado de (FRANKEN *et al.*, 2006). Sucintamente, 150 e 800 células por poço das linhagens A2780 e OVCAR3, respectivamente, foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24h de aderência, as células foram tratadas com BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e também pré-tratadas com o inibidor seguido do tratamento associado com o inibidor de PDE7 e PTX por 10 dias. Após o período de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com formaldeído 4% (p/v). As células foram coradas com cristal violeta 0,1% (p/v) diluído em solução salina. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.12 IMUNOHISTOQUÍMICA

O estudo foi aprovado pelo IRB institucional (protocolo nº 42/07; data de aprovação 01/08/2007); todas as pacientes envolvidas no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os blocos de tecidos ovarianos fixados em formalina e embebidos em parafina foram resgatados dos Serviços de Patologia dos hospitais colaboradores: Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória-ES e o HC II/INCA, Rio de Janeiro, RJ. Todos os casos e seus diagnósticos histopatológicos foram revisados pelos patologistas colaboradores, os quais delimitaram nas lâminas cortes de $5 \mu\text{m}$ contendo fragmentos de 2mm de diâmetro,

correspondentes a áreas representativas de tumores ovarianos.

A expressão da proteína CLDN-16 foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica utilizando as plataformas de tissue array construídas no nosso laboratório, contendo tecido renal como controle interno positivo. Brevemente, secções 5 µm de espessura foram cortadas do tissue array e adicionadas às lâminas silanizadas e, em seguida, desparafinadas em xileno e hidratadas com banhos de etanol (100%, 95%, 80%, respectivamente). Para recuperação antigênica, as amostras foram incubadas com solução recuperadora de antígeno (Tampão Citrato 10mM, pH 6,0) em câmara a vapor por 30 minutos. Posteriormente, o bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a adição de peróxido de hidrogênio 20% (v/v), o que dificulta a reação cruzada entre o substrato DAB (cromógeno associado a peróxido de hidrogênio) e a enzima peroxidase já presentes nos tecidos celulares.

Em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-CLDN-16 (1:1000) (Abcam) a 4 °C, *overnight*. Para a detecção foi utilizado o método de coloração estreptavidina conjugada a peroxidase (DAKO Corporation), segundo protocolo do fabricante. Os cortes foram contracorados com hematoxilina e avaliados por um patologista. Como controle negativo, foi utilizado uma lâmina no qual o anticorpo primário estava ausente. Foi avaliado a presença/ausência e a localização celular de CLDN-16.

- Delineamento Experimental:

As plataformas de tissue array foram construídas pelo nosso grupo dispondo os tecidos lado a lado. Para cada amostra consta as informação do subtipo tumoral, estadiamento e a quimioterapia recebida pela paciente. A descrição do total de amostras utilizada no experimento está descrito no QUADRO 3.

A score foi dado pelo patologita colaborador. Cada lâmina continha o controle positivo (parte da alça Henle do tecido renal de camundongo) e a partir da positividade do controle positivo, os demais casos eram analisados quanto à presença/ausência e localização celular.

Quadro 3: Descrição das plataformas de tissue array utilizadas no experimento de imunohistoquímica.

Plataformas de tissue array	Número de casos
Terceira Plataforma	24 amostras
Quarta Plataforma	29 amostras
Quinta Plataforma	15 amostras
Sexta Plataforma	16 amostras
Sétima Plataforma	4 amostras
Total	88 amostras

4.13 MICROSCOSPIA ELETRÔNICA DE VARETURRA

Para caracterização da integridade na superfície celular, as células das linhagens A2780 e OVCAR3 foram semeadas na densidade de $0,4 \times 10^6$ células/ mL em placa de 12 poços sob lamínulas específicas para o crescimento celular que foram previamente esterilizadas com álcool 70%. Após 24 h de aderências, as células foram incubadas com DMSO (controle), BRL50481 e PTX no tempo de tratamento de 24h e pré-tratadas com BRL50481 e tratadas em seguidas com BRL50481 associado ao PTX. Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 em temperatura ambiente e, posteriormente, as célula foram fixadas com o glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1M pH 7,2. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes no mesmo tampão, durante 5 minutos cada etapa, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, lavadas três vezes com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de álcool: 50%, 70%, 90% e a 100% (20 minutos cada etapa). As amostras foram secas em aparelho de ponto crítico Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer, montadas em stubs, pulverizadas com paládio (metalização) no aparelho Sputter Coater SDC 050 e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS XVP EVO 40 a 15 KV.

4.14 MICRÓSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise por microscopia eletrônica por transmissão, as células das linhagens A2780 e OVCAR3 foram semeadas na densidade de $0,4 \times 10^6$ células/ mL em placa

de 12 poços e mantidas a 37 °C a 5% CO₂. Após 24 h de aderências, as células foram incubadas com DMSO (controle), BRL50481 no tempo de tratamento de 6 h, PTX no tempo de tratamento de 24h e pré-tratadas com BRL50481 e tratadas em seguida com BRL50481 associado ao PTX. Após os tratamentos, as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 em temperatura ambiente e, posteriormente, tripsinizadas e centrifugadas a 2000 rpm por 3 min. O pellet foi lavado duas vezes com o tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 para retirada do excesso de meio de cultura. O material foi então fixado por 2 h a temperatura ambiente utilizando o glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e pós-fixado durante 20 min em na solução 1: 1 de tetróxido de ósmio (1%) e ferrocianeto de potássio (0,8%). Em seguida, o mesmo foi desidratado sequencialmente em uma série graduada de acetona (50-100%) para posterior incorporação em resina epoxi (Poly / Bed 812®). As células embutidas em resina foram colocadas em um molde de silício a 60 ° C durante 48 h para polimerização. Os blocos obtidos foram seccionados e as secções ultrafinas (70 nm de espessura) foram retiradas usando um ultramicrotomo Reichert Ultracut S e coletadas em grades de cobre (400 mesh), coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo, e observadas em microscópio eletrônico transmissão, TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicatas biológicas. Experimentos com dois ou mais grupos com uma variável foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) de uma via com pos-teste de Bonferroni. E experimentos com três ou mais grupos com duas variáveis foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com pos-teste de Bonferroni. Para as análises de correlação, o coeficiente de correlação R^2 foi calculado através de uma regressão linear.

Os testes estatísticos utilizados estão indicados na legenda de cada experimento. Um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Análises estatísticas foram realizadas no software GraphPadPrism v.5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE AMOSTRAS DE TUBA DE FALÓPIO E CARCINOMA OVARIANO SEROSO DE ALTO GRAU A PARTIR DOS DADOS DE RNA-seq

A análise da expressão gênica por RNA-Seq foi desenvolvida no *Molecular Genetics Laboratory of Female Reproductive Cancer*, na *Johns Hopkins University*, com amostras de pacientes com carcinoma de ovário e tuba de falópio. Os resultados obtidos em parceria com o grupo do Dr. Ie-Ming Shih foram validados por qPCR e, posteriormente, investigados utilizando técnicas de biologia molecular e ensaios *in vitro*.

A expressão diferencial dos 243 genes ($p < 0,01$) entre as amostras de tuba de falópio e pacientes com carcinoma ovariano seroso de alto grau está representada na forma de *heat map* (FIGURA 8). Além disso, os dados mostraram que a proteína PDE7-A encontra-se 2,54 vezes ($p = 1,00E-04$) mais expressa em amostras de carcinoma ovariano seroso de alto grau quando comparado à tuba de falópio, ocupando a sétima posição entre 243 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$). Esse dado foi instigante visto a inexistência de publicações que correlacionem PDE7-A e CAO e pelo fato de inibidores não seletivos de PDE4 e PDE7, como o roflumilaste, estarem em estudos de triagem clínica nos Estados Unidos para o tratamento de tumores malignos hematológicos (NCT01888952).

Ademais, os 243 genes diferencialmente expressos ($p < 0,01$) foram analisados utilizando o software *Ingenuity pathway analysis*, uma ferramenta de análise e de pesquisa que revela a significância dos dados obtidos do RNA-seq e auxilia na identificação de novos candidatos a biomarcadores nos sistemas biológicos. Neste contexto, as principais vias canônicas encontradas estão relacionadas com a fibrose hepática, a sinalização via TREM-1 (Antígeno CD354), a regulação do ponto de checagem ao dano ao DNA em G2/M e o ciclo γ -Glutamil (FIGURA 9). Os principais genes reguladores com expressão aumentada descritos foram o fator de necrose tumoral (*TNF*), o fator de transcrição ESE3 (*EHF*), o fator de crescimento de transformação $\beta 1$ (*TGF β 1*), a enzima lisina N-Metil transferase 6 (*EZH2*) e *TP53*.

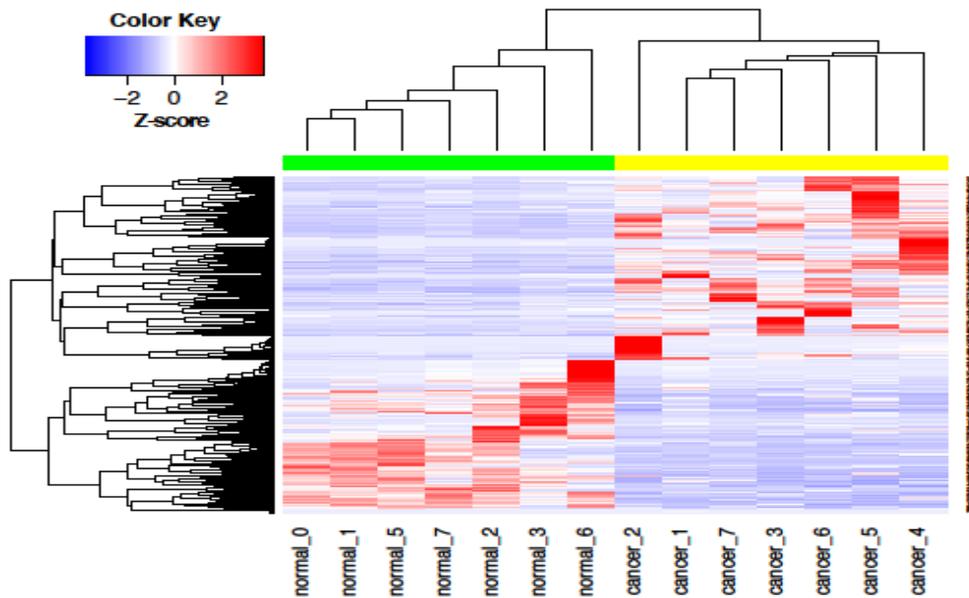


Figura 8: Expressão gênica diferencial entre amostras de tuba de falópio e pacientes com carcinoma ovariano seroso de alto grau baseado em dados de RNA-seq: *heat map* com conjunto de 243 genes ($p < 0,01$). A cor vermelha representa uma maior abundância de genes relativos em comparação com a média, enquanto a cor azul ilustra a expressão relativa dos genes abaixo da média. A barra de cor verde mostra amostras de tuba de falópio e a de amarelo as amostras de carcinoma ovariano.

Conforme mostrado, uma importante via canônica que encontra-se diferencialmente modulada no conjunto de dados obtidos do estudo do transcriptoma é a regulação do ciclo celular no ponto de checagem em G2/M. Esse dado será melhor explorado nas análises seguintes aos associarmos o quimioterápico PTX e o inibidor de PDE7.

Outra interessante via celular modulada é a sinalização por TREM-1. Esta medeia a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e desempenha um papel em uma variedade de distúrbios associados à inflamação (LUO *et al.*, 2010). Além disso, a ativação de TREM-1 induz preferencialmente a expressão do fator de estimulação de formação de colônia 1 (M-CSF) (DOWER *et al.*, 2008), sugerindo ainda um papel importante no câncer e na sepse (SIGALOV, 2014).

5.2 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PDE7-A EM LINHAGENS CELULARES POR qPCR E IMUNOBLOT

A fim de confirmar o resultado obtido do RNA-seq, foram realizados experimentos de análise de expressão gênica e protéica da enzima PDE7-A utilizando linhagens celulares de CAO. Conforme observado na FIGURA 10A, as linhagens derivadas de carcinoma seroso de alto grau, OVCAR3 e OVCAR4, apresentaram maior

expressão gênica de PDE7-A quando comparado à linhagem de tuba de falópio (FT2821) e às linhagens de tecido de ovário normal (OSE4, OSE7, OSE10 e OSE 80pc). Em relação à expressão protéica, também observou-se maior expressão de PDE7-A nas linhagens derivadas de carcinoma seroso de alto grau OVCAR3, OVCAR4, OVCAR5, OVCAR8 e SKOV3 comparado às linhagens FT 2821, OSE 4, OSE 7 e OSE 10 (FIGURA 10B).

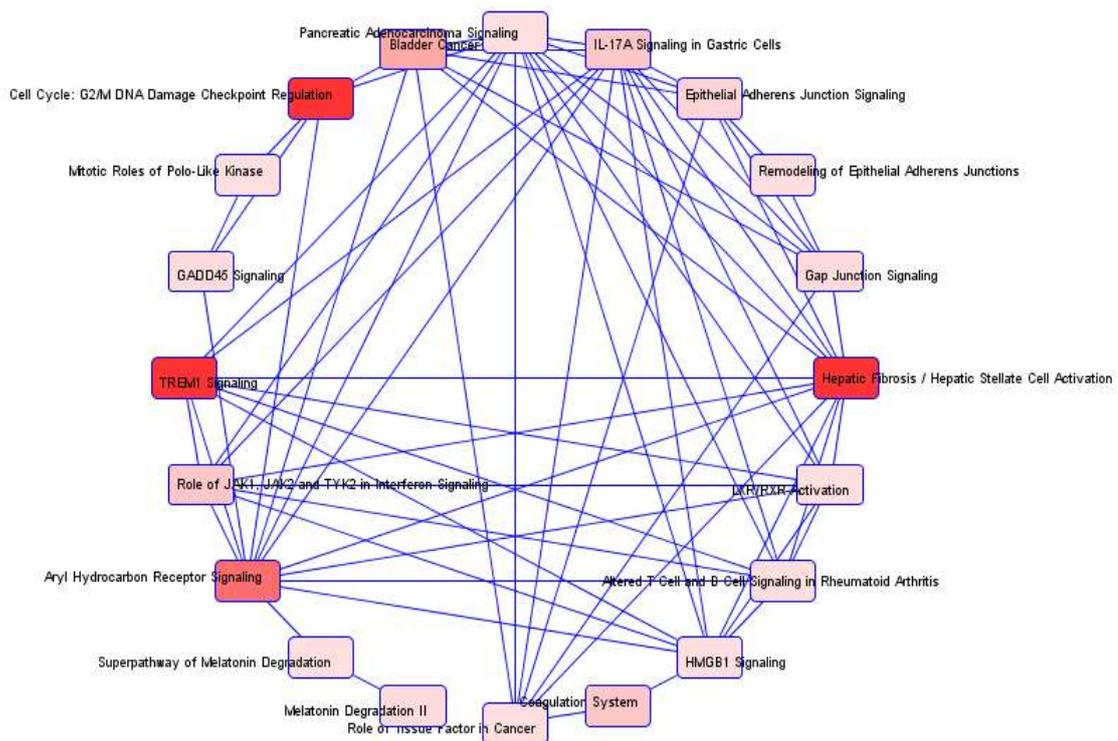


Figura 9: Principais vias canônicas alteradas a partir da análise dos dados do RNA-seq utilizando a ferramenta de bioinformática *Ingenuity pathway analysis (IPA)*.

Assim, os resultados obtidos corroboraram com os dados do RNA-seq, no qual PDE7-A apresentou maior expressão em amostras de carcinoma de ovário seroso de alto grau quando comparado à da tuba de falópio. Esse dado inédito nos instigou a melhor compreender o papel desta proteína no carcinoma de ovário e os mecanismos envolvidos.

PDEs têm sido investigadas em uma variedade de tumores e os estudos sugerem que estas enzimas podem estar mais ativas nestes tecidos, afetando diretamente os níveis de cGMP e cAMP intracelulares. Portanto, agentes que aumentam os níveis deste mensageiros secundários inibindo a hidrólise catalisada pelas PDEs ganharam

destaque como potenciais alvos na terapia anti-tumoral. Um dos principais mecanismos de ação descrito para os mesmos consiste na inibição do crescimento das células tumorais e à indução da apoptose (SAVAI *et al.* 2010).

Além disso, o uso destes inibidores já vêm sendo preconizado no tratamento de outras doenças como asma, na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), na hipertensão pulmonar e esclerose múltipla (HOUSLAY *et al.* 2005; NAVIGLIO *et al.*, 2009), o que minimiza a preocupação com a toxicidade de alguns fármacos. Diversos estudos já demonstraram a participação de isoformas individuais de PDE na promoção da sobrevivência e motilidade celular em diferentes tipos de câncer como próstata (HENDERSON *et al.*, 2014; POWERS *et al.*, 2015), mama (NIDHYANANDAN *et al.* 2015), leucemia de células T (DONG *et al.*, 2010) e cólon (AHMAD *et al.*, 2015).

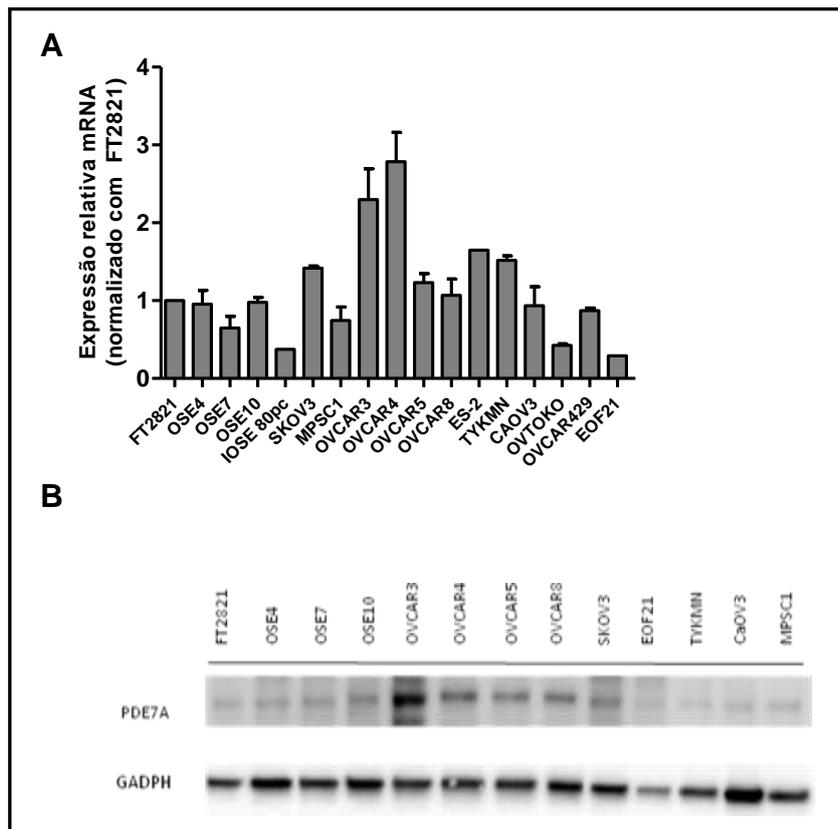


Figura 10: Validação do resultado de RNA-seq utilizando linhagens celulares por meio de qPCR (A) e *Western blot*(B).

Para experimento de análise da expressão gênica, foi utilizado como referência a amostra FT 2821. Os ensaios de qPCRs foram realizados em duplicata (N=2). Média e desvio-padrão estão mostrados no gráfico. Para análise da expressão protéica de PDE7-A, foi utilizado como normalizador a proteína GAPDH.

Diante do exposto, verificou-se o papel da PDE7 no CAO V utilizando um inibidor seletivo comercialmente disponível denominado BRL50481 tanto em monoterapia quanto em associação com os quimioterápicos padrão cisplatina e paclitaxel.

5.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 UTILIZANDO BRL50481 EM MONOTERAPIA EM LINHAGENS DE CAO V

O efeito da inibição competitiva da PDE7 na viabilidade celular metabólica (VCM) nas linhagens de CAO V foi avaliado pelo método de MTT. Nos ensaios foram utilizados duas linhagens de carcinoma ovariano: A2780 e OVCAR3. Conforme descrito no QUADRO 2, as linhagens apresentam diferenças quanto à classificação histológica e resistência aos quimioterápicos CISP e PTX.

Inicialmente, calculou-se o valor da IC_{50} para CISP, PTX e BRL50481 utilizando as condições experimentais descritas na TABELA 2. Brevemente, para o cálculo da IC_{50} comparou-se a VCM das células tratadas com diferentes concentrações dos agentes quimioterápicos com a VCM do controle (células não-tratadas). Como controle negativo, as células foram tratadas apenas com o veículo (DMSO ou PBS) no qual a droga foi diluída (dados não mostrados). Em relação à potência, os quimioterápicos CISP e PTX apresentaram maior potência na linhagem A2780 quando comparada à linhagem OVCAR3 (TABELA 10), corroborando com os dados da literatura que mostram que a linhagem OVCAR3 apresenta resistência intrínseca aos quimioterápicos (SAKHARE *et al.*, 2014; STORDAL *et al.*, 2013).

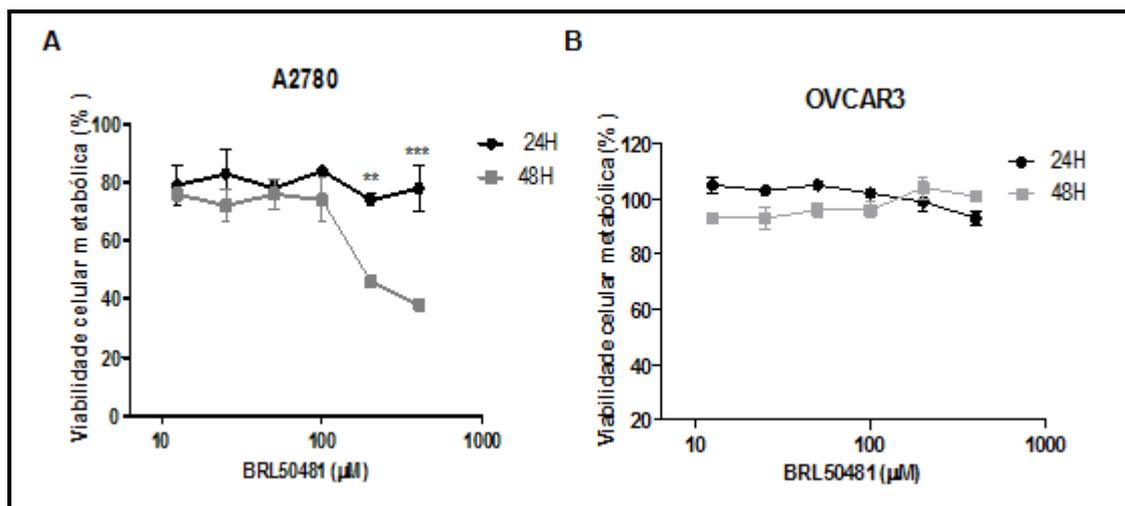
Já o composto BRL50481 não apresentou efeito inibitório nas linhagens A2780 e OVCAR3 no tempo de tratamento de 24h. No entanto, após 48h de tratamento, a linhagem A2780 mostrou-se mais sensível ao inibidor quando comparada à OVCAR3 (FIGURA 11), o que pode ser atribuído às diferenças intrínsecas das linhagens.

Tabela 10: Valor das IC_{50} estimadas nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Quimioterápicos	IC_{50}	IC_{50}^*
	A2780	OVCAR3
Cisplatina 24h	14 μ M	140 μ M
Cisplatina 48h	1,6 μ M	17 μ M
Paclitaxel 24h	0,53 μ M	12,5 μ M
Paclitaxel 48h	0,003 μ M	1,3 μ M
BRL50481 48h	200 μ M	-----

* Estabeleceu-se a concentração de 400 μ M (maior concentração avaliada dentro da faixa de concentrações proposta na TABELA 2 para os experimentos de VCM) como valor referencial para ser utilizada nos demais estudos para a linhagem OVCAR3. Foi estabelecido este valor devido à toxicidade do diluente da droga (DMSO) para as células. Para o cálculo da IC_{50} foi utilizado o software GraphPadPrism v.5.

Na linhagem A2780, observou-se uma redução da VCM em torno de 60% quando comparado os tempos de tratamento de 24 e 48h. A redução na VCM é dose-dependente e ocorreu apenas nas duas maiores concentrações avaliadas (200 μ M e 400 μ M) ($p < 0,05$) (FIGURA 11A). Dessa forma, para o cálculo da IC_{50} utilizou-se o tempo de tratamento de 48h e o valor encontrado foi aproximadamente de 200 μ M (TABELA 10).

**Figura 11:** Efeito do BRL50481 na VCM pelo método de MTT.

Células da linhagem A2780 (A) e OVCAR3 (B) foram tratadas com diversas concentrações do inibidor seletivo de PDE7 por 24 h e 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Conforme apresentado na FIGURA 11B, o composto BRL50481 não afetou a VCM da linhagem OVCAR3 em ambos os tempos analisados. Assim, como não foi possível estimar o valor da IC₅₀ para a referida linhagem, foi estabelecida a concentração de 400 µM como valor referencial utilizado nos demais experimentos (TABELA 10).

Diversos estudos vêm demonstrando o uso de inibidores seletivos de PDE em diferentes tipos de câncer. A exemplo, o uso de inibidores seletivos de PDE4D, NVP-ABE171 e cilomilaste, no tratamento do câncer de próstata em modelos *in vitro* e *in vivo* promoveu diminuição do crescimento celular, mostrando o grande potencial terapêutico dessa classe de fármaco (POWERS *et al.*, 2015). Além disso, o emprego dos inibidores de PDE4, rolipram e Ro-20-1724, proporcionou supressão da quimiotaxia em células de câncer de cólon. Assim, os autores sugerem o papel crítico da PDE4 na regulação dos níveis intracelulares de cAMP e na progressão do câncer de cólon (MURATA *et al.*, 2000).

Conforme mostrado por SMITH *et al.* (2004), o inibidor BRL50481 foi utilizado inicialmente em linhagens celulares de linfócitos CD8⁺ e promoveu diminuição da proliferação apenas quando empregado concomitantemente com o inibidor de PDE4. Além disso, outros estudos também têm proposto a inibição dual de PDE4 e -7 como uma estratégia efetiva no tratamento da asma e outras doenças caracterizadas por fenótipos inflamatórios, visto que a maioria das células inflamatórias expressam ambas as moléculas e as drogas seletivas de PDE4 e -7 possuem efeito sinérgico na supressão da inflamação (GIEMBYCZ; NEWTON, 2011).

5.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 UTILIZANDO BRL50481 EM ASSOCIAÇÃO À CISPLATINA EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V

As células de CAO V podem apresentar resistência intrínseca ou adquirida às drogas citotóxicas e uma estratégia terapêutica amplamente utilizada e alvo de novos estudos é a associação de fármacos de diferentes classes.

Um estudo conduzido por YOSHIDA *et al.* (2000) já havia verificado que a associação de teofilina (inibidor não específico de PDE) e cisplatina aumentou a incidência de apoptose em células granulosas humanas transformadas com

oncogenes Ha-ras e p53 mutados e na linhagem celular de CAO V OC-109. Além disso, efeito aditivo da associação de cisplatina com o inibidor de PDE dipiridamol reduziu a sobrevivência celular em torno de 65% em ambas as células de carcinoma de ovário sensíveis e resistentes à cisplatina (HOWELL *et al.*, 1987). Ademais, estudos conduzidos por MANN *et al.* (1991) em células de CAO V com agentes que elevam os níveis de cAMP como forskolina e isobutilmetilxantina, os autores observaram que o tratamento promoveu o aumento da sensibilidade ao derivado de platina comparado às células não-tratadas.

Dessa forma, motivados em investigar a associação do inibidor BRL50481 com quimioterápicos classicamente utilizados no tratamento de CAO V, as linhagens A2780 e OVCAR3 foram tratadas com CISP (a faixa de concentração utilizada encontra-se descrita na TABELA 2) associada ao composto BRL50481.

Os tratamentos combinados de CISP com BRL50481 (100 μM e 200 μM) não promoveram diminuição na VCM na linhagem A2780 no tempo de tratamento de 24h. Ao contrário, observou-se um aumento significativo na VCM quando as células foram tratadas com CISP nas concentrações 100; 50 e 25 μM associadas à 200 μM de BRL50481 (valor referente à IC_{50} do inibidor) (FIGURA 12A).

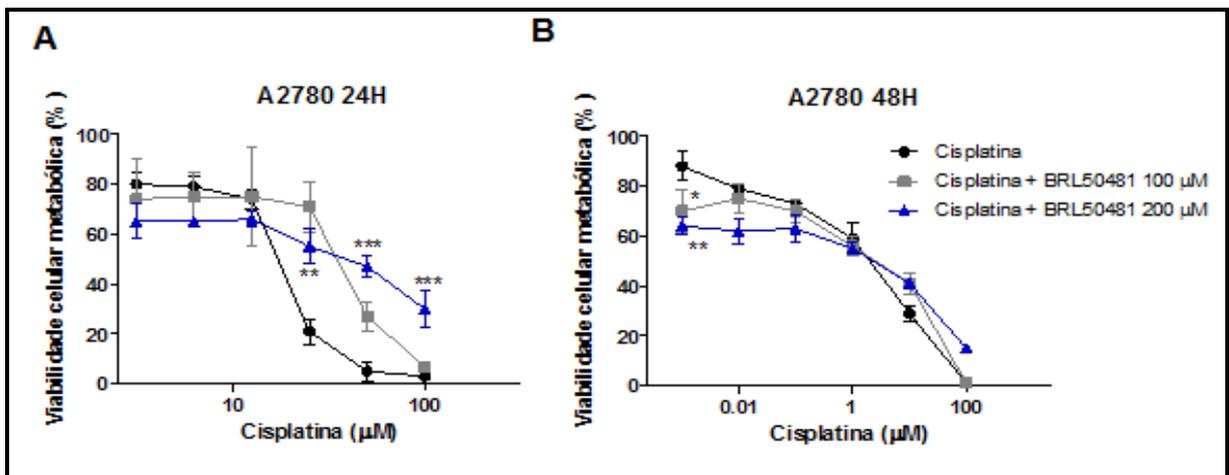


Figura 12: Efeito da combinação de BRL50481 e CISP na VCM pelo método de MTT em A2780.

Células da linhagem A2780 foram tratadas com CISP em monoterapia e em associação com BRL50481 em duas concentrações, 100 μM e 200 μM , por 24h (A) e 48h (B). Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Embora a associação de CISP (0,001 μM) com BRL50481 (200 μM) tenha

promovido uma redução na VCM em torno de 24% ($p < 0,01$), no tempo de tratamento de 48h, a combinação com CISP resultou na seleção de clones resistentes à droga, de modo a mimetizar observações clínicas do tratamento de CAO (MCGUIRE *et al.*, 1996) (FIGURA 12B).

A fim de verificar se a cronologia dos tratamentos traria benefícios na associação de CISP com BRL50481, as células da linhagem A2780 foram pré-tratadas com o inibidor seletivo de PDE7 na concentração de 200 μM por 24h e, em seguida, tratadas com CISP associada à 200 μM do inibidor por 24h. O pré-tratamento não apresentou eficácia na diminuição da VCM quando comparado à associação de CISP com BRL50481 bem como ao tratamento com cisplatina em monoterapia no tempo de 24h (FIGURA 13).

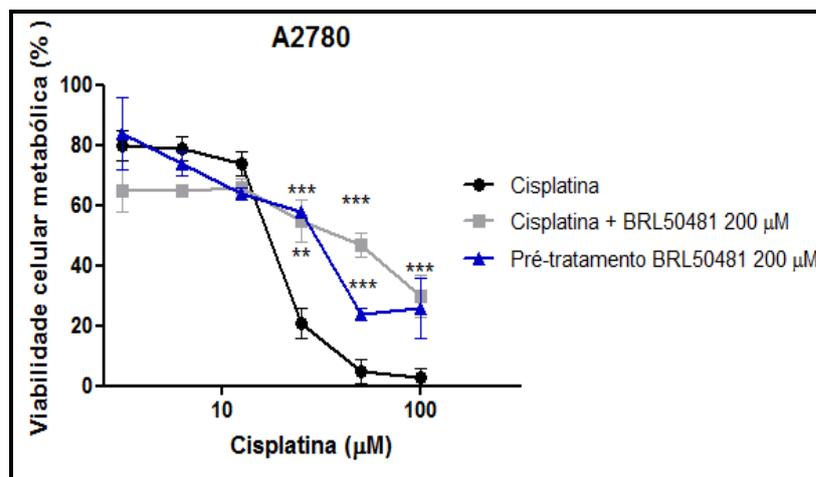


Figura 13: Efeito do pré-tratamento de BRL50481 na VCM pelo método de MTT em A2780. Células da linhagem A2780 foram pré-tratadas com BRL50481 200 μM e, posteriormente, tratadas com CISP em associação a 200 μM de BRL50481 por 24h. Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Já na linhagem OVCAR3, a associação de CISP (50 μM) e BRL50481 nas concentrações de 200 e 400 μM promoveu uma redução na VCM em torno de 35 e 32%, respectivamente, no tempo de tratamento de 48h ($p < 0,01$). Também foi observada uma diminuição de 28% na VCM utilizando a menor concentração de CISP (1,56 μM) associada à 400 μM de BRL50481 ($p < 0,5$) (FIGURA 14B). Diferentemente do que foi observado na linhagem A2780, a associação de CISP e BRL50481 não favoreceu ao aumento da VCM (comparado ao tratamento com CISP em monoterapia) no tempo de tratamento de 24h (FIGURA 14A).

Embora o pré-tratamento das células da linhagem OVCAR3 com 400 μM de BRL50481 por 24h e posterior associação de CISP com 400 μM do inibidor não tenha promovido maior redução da VCM quando comparado à associação de CISP e BRL50481, observou-se uma maior redução na IC_{50} empregada (FIGURA 15).

Apesar da associação dos compostos CISP e BRL50481 não apresentar efeito significativo na diminuição da VCM em ambas as linhagens avaliadas, na linhagem celular OVCAR3 é possível observar efeitos benéficos desta associação na redução da IC_{50} em 48h de tratamento (TABELA 11). A associação de CISP e BRL50481 nas concentrações de 200 e 400 μM promoveu redução na IC_{50} em torno de 3,1 e 4,25 vezes, respectivamente, comparado às células tratadas apenas com CISP no tempo de tratamento de 48h. Além disso, o pré-tratamento das mesmas com 400 μM de BRL50481 também reduziu em torno de 2,2 vezes o valor da IC_{50} . (TABELA 11).

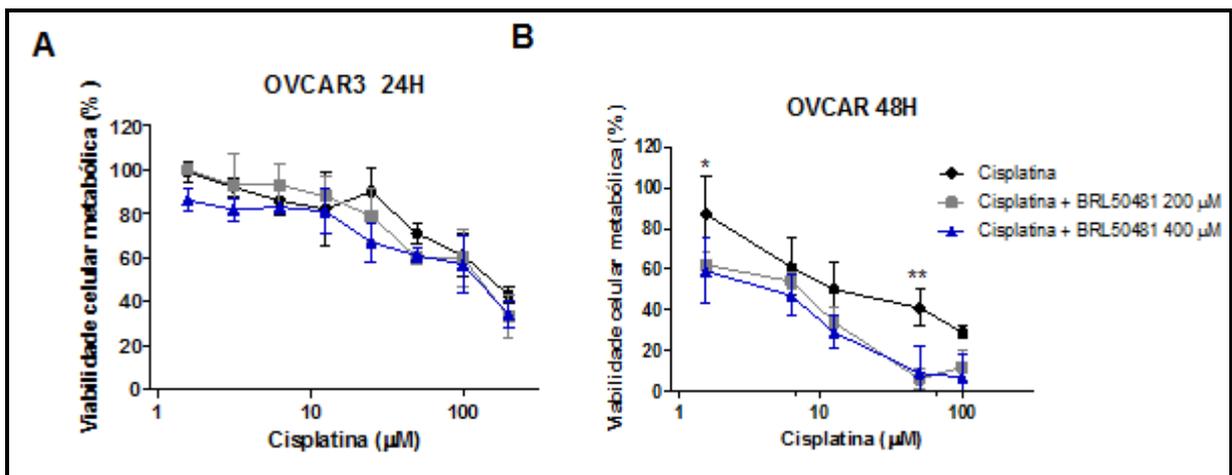


Figura 14: Efeito da combinação de BRL50481 e CISP na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.

Células da linhagem OVCAR3 foram tratadas com CISP em monoterapia e em associação com BRL50481 em duas concentrações, 200 μM e 400 μM , por 24h (A) e 48h (B). Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

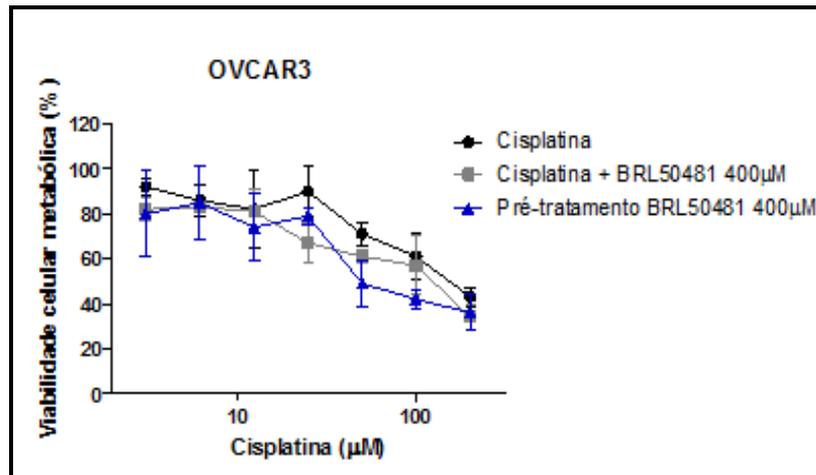


Figura 15: Efeito do pré-tratamento de BRL50481 na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.

Células da linhagem OVCAR3 foram pré-tratadas com 400 µM BRL50481 e, posteriormente, tratadas com CISP em associação com 400 µM BRL50481 por 24h. Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni.

Tabela 11: Valor das IC₅₀ estimadas para CISP em monoterapia e em associação com BRL50481 nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Linhagens	Condições experimentais	IC ₅₀
A2780	Cisplatina 24h	14 µM
	Cisplatina +BRL50481 100 µM 24h	26,5 µM
	Cisplatina +BRL50481 200 µM 24h	26,5 µM
	Cisplatina 48h	1,6 µM
	Cisplatina +BRL50481 100 µM 48h	1,8 µM
	Cisplatina +BRL50481 200 µM 48h	1,5 µM
	Pré-tratamento BRL50481 200 µM (24h)	24 µM
	Cisplatina + BRL50481 200 µM (24h)	24 µM
OVCAR3	Cisplatina 24h	140 µM
	Cisplatina +BRL50481 200 µM 24h	102 µM
	Cisplatina +BRL50481 400 µM 24h	82 µM
	Cisplatina 48h	17 µM
	Cisplatina +BRL50481 200 µM 48h	5,4 µM
	Cisplatina +BRL50481 400 µM 48h	4,0 µM
	Pré-tratamento BRL50481 400 µM (24h) Cisplatina + BRL50481 400 µM (24h)	64 µM

Para o cálculo da IC₅₀ foi utilizado o software GraphPadPrism v.5

O cAMP é um importante mediador de diversas respostas celulares e sua hidrólise pelas PDEs é um dos mecanismos utilizados para promover a homeostase celular (BEAVO; BRUNTON, 2002). Essas enzimas são expressas em tecidos específicos e a compartimentação das mesmas permite o controle rigoroso dos gradientes de

cAMP em todas as células (HOUSLAY; ADAMS, 2003). A importância das PDEs na engenharia dos gradientes de cAMP é claramente demonstrada pela eficácia terapêutica de inibidores seletivos de PDE como os fármacos no combate a um número crescente de doenças humanas (BAILLIE *et al.*, 2005).

Além disso, o cAMP regula várias funções celulares como metabolismo, secreção, proliferação celular, diferenciação e indução de gene por meio da ativação de diversas vias de sinalização como a via da PKA (ALPER; HACKER; CHO-CHUNG, 1999; CHEADLE *et al.*, 2008)

A enzima PKA é uma serina-treonina cinase e principal molécula efetora da via de sinalização do cAMP na maioria das células. Classicamente, está amplamente envolvida na regulação do crescimento e proliferação celular. Evidências experimentais demonstraram que as duas isoformas da PKA, PKA-I e PKA-II, atuam como reguladores intracelulares positivos e negativos, respectivamente, do crescimento celular (CHO-CHUNG, 1990). A PKA-I é apenas transitoriamente superexpressa em células normais em resposta aos estímulos fisiológicos da proliferação celular enquanto que, em contraste, é constitutivamente superexpressa em células cancerosas e sua maior expressão está associada ao mau prognóstico em diferentes tipos de câncer. Por outro lado, a expressão de PKA-II é induzida na parada do crescimento das células cancerosas por análogos de cAMP e agentes de diferenciação. Além disso, o desequilíbrio entre as isoenzimas de PKA está altamente associado à tumorigênese e ao crescimento tumoral (CHEADLE *et al.*, 2008).

Dados da literatura já demonstraram que a inativação funcional da PKA resultou no aumento do reparo ao DNA e na aquisição de resistência à cisplatina. Os autores sugeriram que a transdução de sinal ativado por cAMP pode regular a sensibilidade à cisplatina, constituindo, assim, uma possível via de modulação para a resistência (CVIJIC *et al.* 1998). CVIJIC *et al.* 1997 ainda mostrou que a subunidade R1 α pode encontrar-se mutada ou superexpressa e exercer outras funções celulares além de inibir a atividade cinase da subunidade catalítica de PKA.

Além disso, moléculas como o dipiridamol e as metilxantinas, incluindo a cafeína, a pentoxifilina e a isobutylmetilxantina são capazes de aumentar os níveis

intracelulares de cAMP por meio da inibição de PDE e, conseqüentemente, a ativação de PKA e o aumento da fosforilação dos fatores de reparo ao DNA. O aumento do nível de cAMP pode aumentar a interação da subunidade R com os componentes da via de reparo por excisão de nucleotídeos e este processo pode levar à inibição do reparo do dano ao DNA. Esse mecanismo de ação dependente de cAMP pode ser atribuído à via não canônica de sinalização de PKA (CVIJIC *et al.* 1998; CVIJIC *et al.*, 1997) (FIGURA 16). Dessa forma, parte do mecanismo de ação na potenciação da citotoxicidade induzida por cisplatina observado na linhagem OVCAR3 pode ser atribuído à via não canônica de sinalização de PKA mediada por cAMP.

Ademais, estudo conduzido por HAN *et al.* (2006) mostrou que PDE7-A1 possui um sítio na região N-terminal que contém um domínio de pseudo-substrato de PKA que medeia a formação de um complexo com a subunidade catalítica de PKA (C). Essa região N-terminal de PDE7-A1 inibiu a atividade catalítica de C nas células CHO-K1 e também suprimiu a resposta fisiológica independente de cAMP em leveduras. Assim, PDE7-A1 possui uma atividade não catalítica que pode contribuir para terminar a via de sinalização por cAMP via inibição direta de C.

Nossos dados mostraram que as linhagens A2780 e OVCAR3 apresentaram diferentes mecanismos de resposta quanto à associação do inibidor de PDE7 e CISP. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato da linhagem OVCAR3 apresentar uma resistência intrínseca à cisplatina (dado confirmado pelo ensaio da VCM pelo método do MTT (TABELA 10) e, assim, esta linhagem pode apresentar menor atividade de PKA. E a associação do inibidor de PDE7 com cisplatina no tempo de tratamento de 48h trouxe um impacto significativo para o tratamento do carcinoma de ovário. O mesmo efeito não foi observado na linhagem A2780. Vale ressaltar que para determinar o exato mecanismo envolvido em ambas as linhagens após a combinação de CISP e BRL50481 será necessário avaliar a atividade enzimática de PKA.

Interessantemente, um estudo publicado por SON *et al.* (2001) em linhagens de A2780 sensíveis e com resistência induzida à cisplatina superexpressando a subunidade R1 α , os autores encontraram que a linhagem resistente à cisplatina com expressão ectópica da subunidade R1 α se tornou mais sensível que a

linhagem parental resistente após o tratamento com cisplatina. Entretanto, a linhagem resistente à cisplatina superexpressando R1 α permaneceu mais resistente quando comparado à linhagem sensível. Os autores discutem sobre a análise de possíveis mutações em PKA R1 α , visto que esse fenótipo já tinha sido reportado em outros trabalhos (CVIJIC *et al.* 1998).

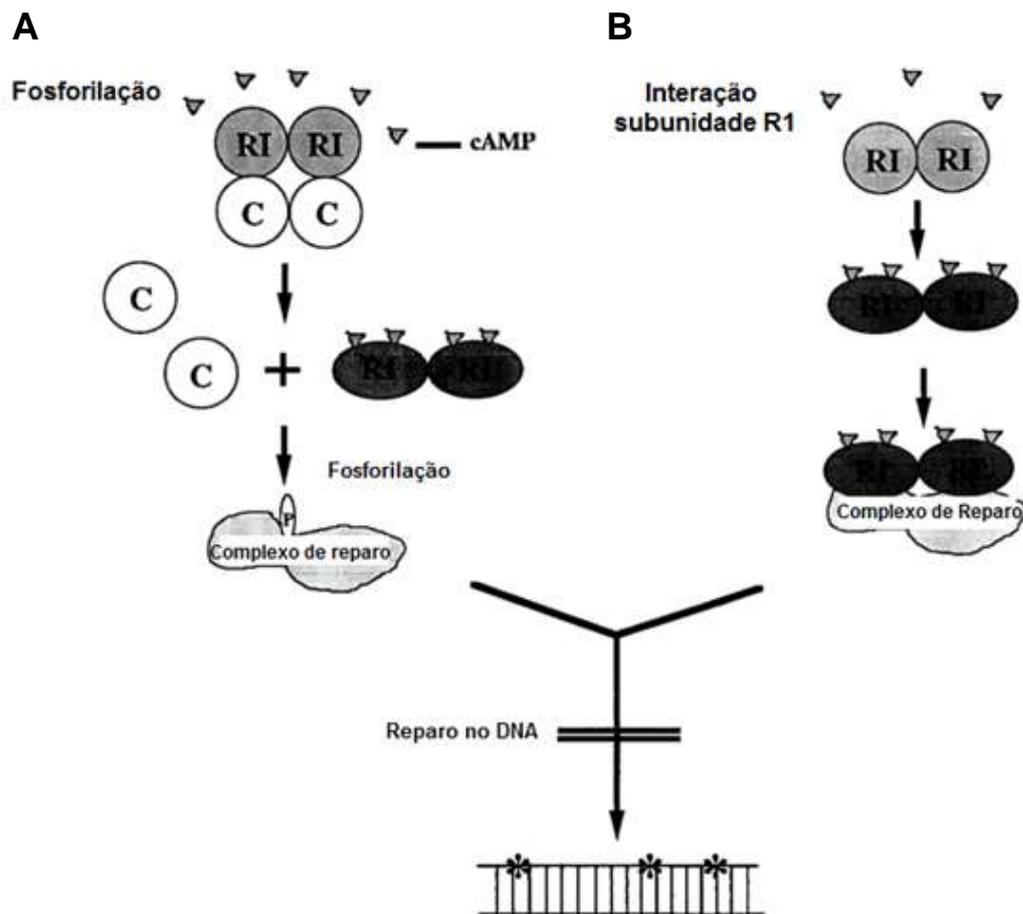


Figura 16: Mecanismos de resistência à cisplatina em mutantes de PKA.

(A) A PKA pode modular a atividade de reparo do DNA através da fosforilação de fatores de reparo (esquerda). (B) O reparo do DNA danificado com cisplatina pode ser regulado pela subunidade R1- α através de interações proteína-proteína do complexo de reparo. Adaptado de CVIJIC *et al.* 1998.

5.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 UTILIZANDO BRL50481 EM ASSOCIAÇÃO AO PACLITAXEL EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V

Instigados em avaliar a associação do inibidor de PDE7 com PTX na VCM, células das linhagens A2780 e OVCAR3 foram tratadas com PTX em monoterapia e em associação com BRL50481.

Conforme apresentado na Figura 17A, para a linhagem A2780, a associação de PTX (0,001 e 0,01 μM) com BRL50481 (200 μM) promoveu uma redução em torno de 20% na VCM quando comparado ao tratamento com PTX em monoterapia ($p < 0,05$), após 24h de tratamento. No tempo de tratamento de 48h, a associação de PTX nas duas menores concentrações (0,00001 e 0,000001 μM) com BRL50481 (200 μM) promoveu uma redução em torno de 24% na VCM ($p < 0,01$) (FIGURA 17B).

Ademais, a combinação de BRL50481 200 μM com PTX gerou uma diminuição da IC_{50} em torno de 2,4 vezes; a IC_{50} de PTX em monoterapia passou de 0,53 μM para 0,22 μM quando associado ao inibidor de PDE7 no tempo de tratamento de 24h. No entanto, o mesmo não foi observado após 48h de tratamento, indicando que o efeito é tempo-dependente (TABELA 12).

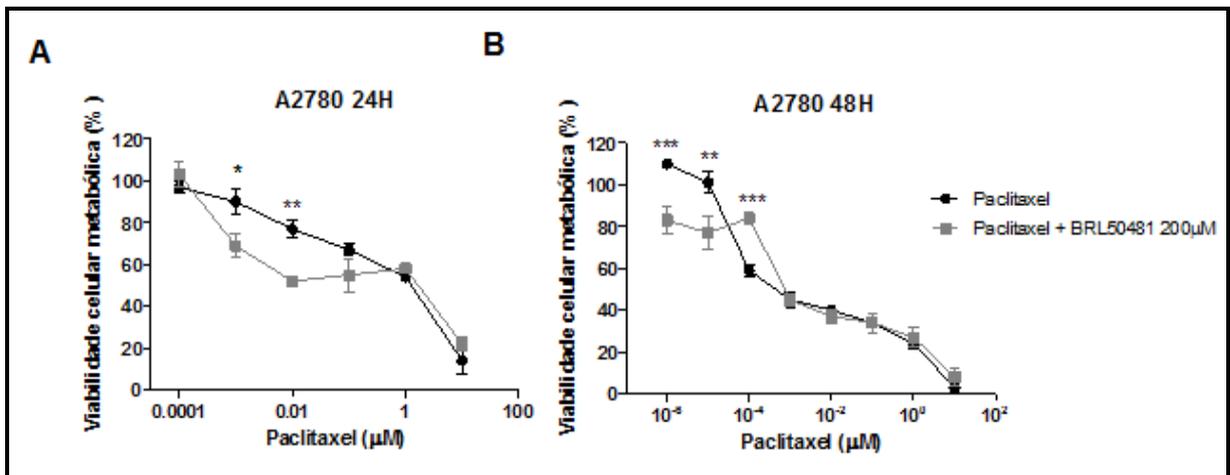


Figura 17: Efeito da combinação de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em A2780.

Células da linhagem A2780 foram tratadas com PTX em monoterapia e associada com BRL50481 na concentração 200 μM por 24h (A) e 48h (B). Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Ao contrário do que foi observado para o quimioterápico CISP, a cronologia no tratamento com PTX proporcionou grandes benefícios à inibição da sobrevivência celular em ambas as linhagens analisadas.

Tabela 12: Valor das IC_{50} estimadas para PTX em monoterapia e em associação com BRL50481 nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Linhagens	Condições experimentais	IC_{50}
A2780	Paclitaxel 24h	0,53 μ M
	Paclitaxel +BRL50481 200 μ M 24h	0,22 μ M
	Pré-tratamento BRL50481 200 μ M (24h)	0,0005 μ M
	Paclitaxel + BRL50481 200 μ M (24h)	
	Paclitaxel 48h	0,003 μ M
	Paclitaxel +BRL50481 200 μ M 48h	0,002 μ M
	Pré-tratamento BRL50481 200 μ M (24h)	0,0003 μ M
	Paclitaxel + BRL50481 200 μ M (48h)	
OVCAR3	Paclitaxel 24h	12,5 μ M
	Paclitaxel +BRL50481 400 μ M 24h	5,6 μ M
	Pré-tratamento BRL50481 400 μ M (24h)	1,7 μ M
	Paclitaxel + BRL50481 400 μ M (24h)	
	Paclitaxel 48h	1,3 μ M
	Paclitaxel +BRL50481 400 μ M 48h	0,86 μ M
	Pré-tratamento BRL50481 400 μ M (24h)	0,02 μ M
	Paclitaxel + BRL50481 400 μ M (48h)	

As células da linhagem A2780 pré-tratadas com 200 μ M de BRL50481 por 24h e posteriormente tratadas com PTX associado a 200 μ M de BRL50481 por 24h, apresentaram redução na VCM em torno de 50% para todas as concentrações de PTX avaliadas quando comparado ao tratamento com PTX em monoterapia ($p < 0,01$) (FIGURA 18A). Em contrapartida, o pré-tratamento com 200 μ M de BRL50481 por 24h e posterior associação de PTX com 200 μ M de BRL50481 por 48h promoveu uma redução na VCM em torno de 30% apenas nas duas menores concentrações de PTX utilizadas (0,000010 e 0,000010 μ M) ($p < 0,001$) (FIGURA 18B).

Comparando a IC_{50} do tratamento com PTX com a IC_{50} estimada do pré-tratamento com BRL50481, o pré-tratamento proporcionou uma redução em torno de mil vezes na concentração de PTX no tratamento de 24h (TABELA 12). Já o pré-tratamento com BRL50481 e posterior associação de PTX com BRL50481 por 48h, proporcionou uma redução em torno de dez vezes na concentração de PTX (TABELA 12).

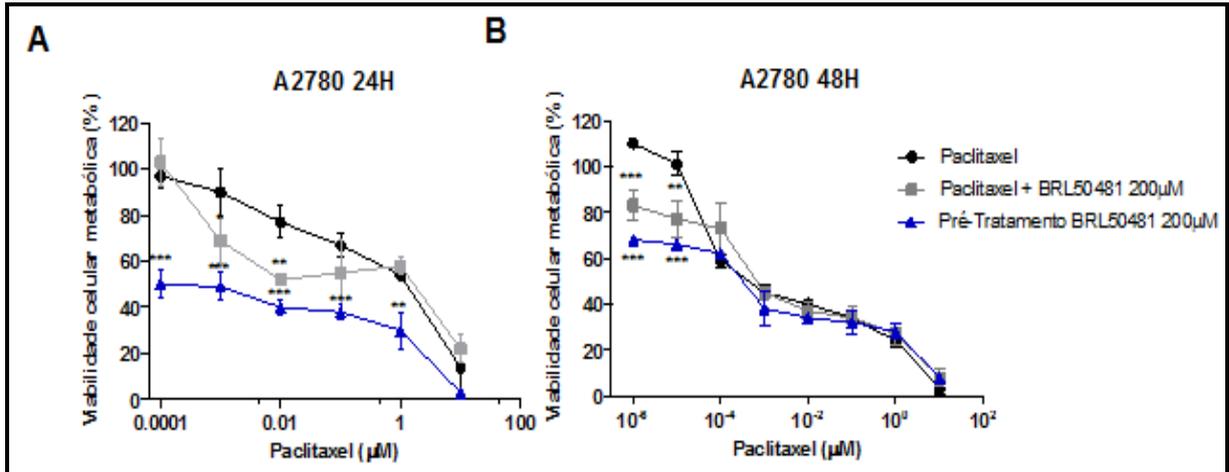


Figura 18: Efeito da combinação e do pré-tratamento de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em A2780.

Células da linhagem A2780 submetidas a três formas de tratamento: PTX em monoterapia, PTX associado a BRL50481 200 µM e o pré-tratamento com BRL50481 200 µM seguido de tratamento com associação de PTX e BRL 50481 200 µM por 24h (A) e 48 h (B). Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Motivados em avaliar se o efeito na VCM seria mantido utilizando menores concentrações de PTX, foi realizado o pré-tratamento das células da linhagem A2780 com BRL50481 200 µM por 24h, seguido do tratamento combinado de BRL50481 200 µM com PTX nas concentrações de 1 nM a 10^{-7} nM por 24h. Conforme se observa na FIGURA 17, o pré-tratamento associado às menores concentrações de PTX apresentou redução da VCM em torno de 70%, mesmo quando utilizada a concentração de 10^{-7} nM de PTX ($p < 0,001$), concentração em que 100% das células se mantêm metabolicamente ativas quando a droga é usada em monoterapia. O valor da IC_{50} estimada para o pré-tratamento foi de $4,86 \times 10^{-8}$ nM.

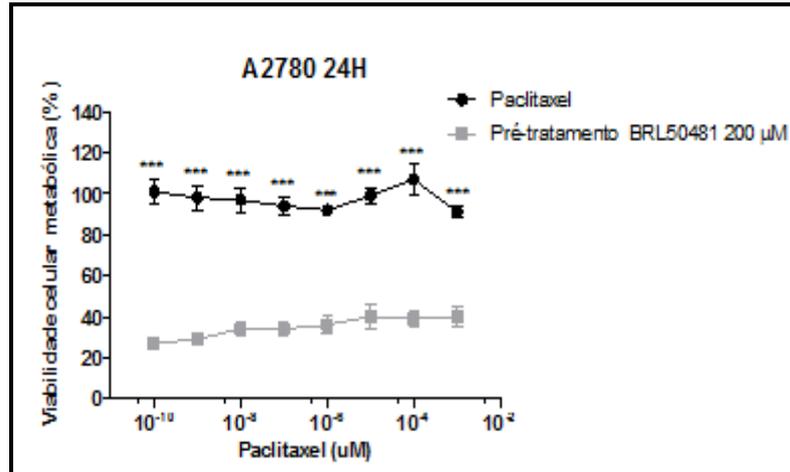


Figura 19: Efeito do pré-tratamento de BRL 50481 associado com baixas concentrações de PTX na VCM de A2780 pelo método de MTT.

Células da linhagem A2780 foram tratadas com PTX (10^{-9} a 10^{-16} M) em monoterapia e pré-tratadas com BRL 50481 200 μ M e, em seguida, tratadas com PTX e BRL 50481 200 μ M por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Todas as concentrações apresentaram significância estatística. *** $p < 0,001$

Estudos farmacocinéticos mostraram que pacientes tratados com 175 mg/m² de PTX, no tempo de infusão de 24h, apresentaram concentração plasmática máxima de 365 ng/mL (402 nM) (*National Library of Medicine*). Utilizando nosso modelo *in vitro*, o pré-tratamento das células A2780 com 200 μ M de BRL50481 e posterior associação com PTX, apresentou uma redução em torno de $82,7 \times 10^8$ vezes na concentração de PTX utilizado. Esse dado mostrou-se muito interessante e promissor, visto que o principal entrave na utilização do PTX como terapia de primeira escolha em pacientes que apresentaram resistência à cisplatina é a alta neurotoxicidade do mesmo, o que faz que muitas pacientes não consigam aderir ao tratamento.

Diante do exposto, nossos dados mostram o efeito benéfico do pré-tratamento com o inibidor seletivo de PDE7 e posterior associação com PTX na inibição da VCM nas células da linhagem de A2780.

Os estudos de associação de BRL50481 e PTX também foram conduzidos em células da linhagem OVCAR3 que apresentam maior resistência aos quimioterápicos CISP e PTX, conforme discutido anteriormente.

Para a linhagem OVCAR3, associação de 3,125 μ M de PTX com 400 μ M de BRL50481 (valor referencial para esta linhagem) promoveu redução na VCM em

torno de 30% quando comparado ao tratamento com PTX em monoterapia ($p < 0,01$) (FIGURA 20A) no tempo de tratamento de 24h. Já no tratamento de 48h, as combinações de 1,25 μM ($p < 0,05$) e 0,6125 μM ($p < 0,01$) de PTX com 400 μM de BRL50481 apresentaram redução na VCM em torno de 25%. (FIGURA 20B).

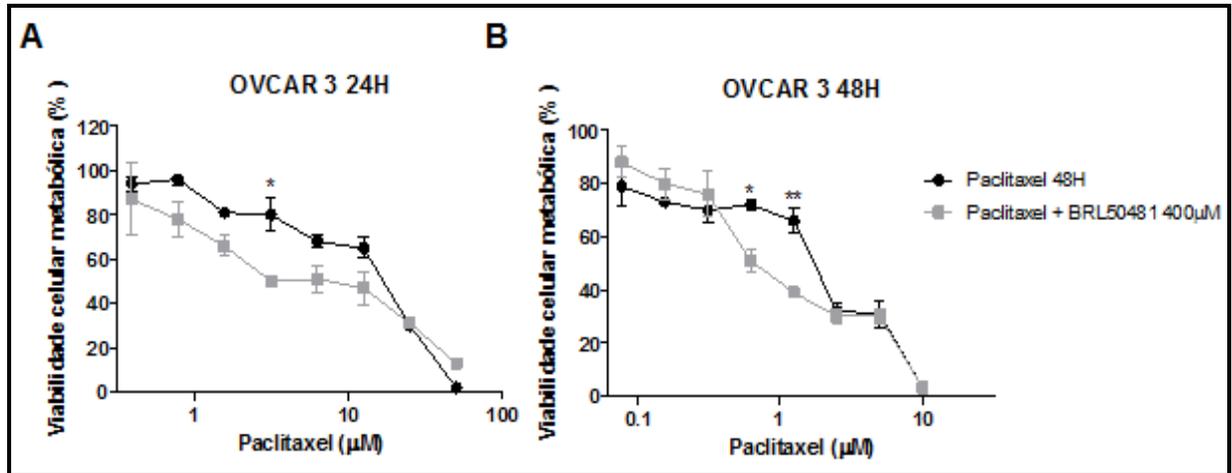


Figura 20: Efeito da combinação de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em OVCAR.

Células da linhagem OVCAR3 foram tratadas com PTX em monoterapia e associada com BRL50481 na concentração 400 μM por 24h (A) e 48h (B). Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Em relação ao valor da IC_{50} , a combinação de 400 μM de BRL50481 com PTX promoveu diminuição da IC_{50} estimada em 2,2 vezes; a IC_{50} de PTX em monoterapia passou de 12,5 μM para 5,6 μM quando associado ao inibidor no tempo de tratamento de 24h. No tempo de tratamento de 48h, não foi observado uma redução no valor da IC_{50} (TABELA 12).

O pré-tratamento com 400 μM de BRL50481 também se mostrou satisfatório na redução da VCM, no qual foi observada uma redução em torno de 50% quando utilizado PTX nas concentrações de 3,12 a 0,390 μM ($p < 0,001$) comparado ao tratamento com PTX em monoterapia no tempo de tratamento de 24h (FIGURA 21A). Comparando a IC_{50} do tratamento com PTX com a IC_{50} estimada do pré-tratamento, observa-se uma redução de sete vezes na concentração de PTX utilizada (TABELA 12).

Após o pré-tratamento das células com 400 μM de BRL50481 e posterior associação de PTX com 400 μM BRL50481 por 48h, observou-se uma redução na VCM em

torno de 40%, utilizando PTX nas concentrações de 0,312 a 0,078 μM ($p < 0,001$), comparado ao tratamento em monoterapia (FIGURA 21B). Também foi observada uma diminuição no valor da IC_{50} estimada de aproximadamente 65 vezes (TABELA 12).

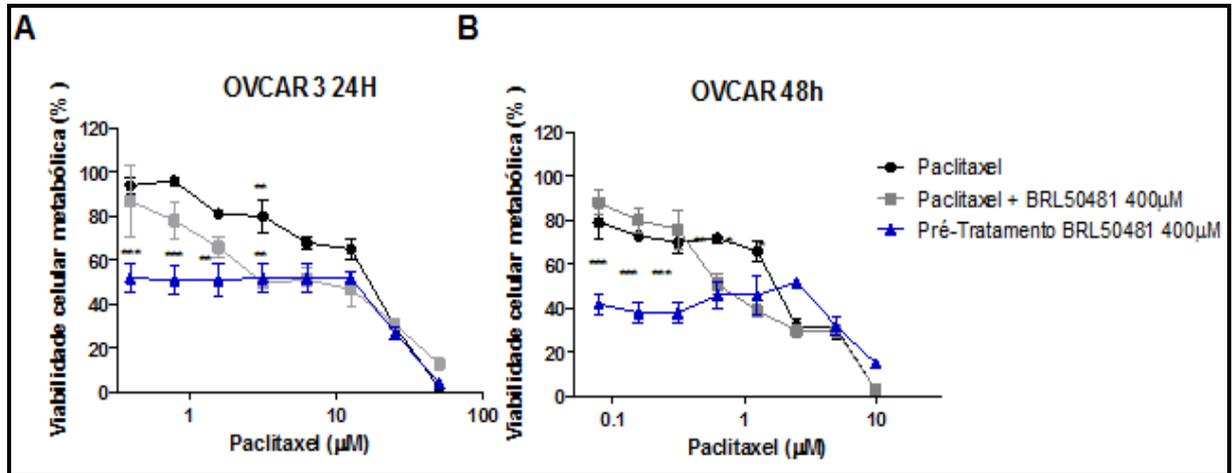


Figura 21: Efeito da combinação e do pré-tratamento de BRL50481 e PTX na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.

Células da linhagem OVCAR3 foram submetidas a três formas de tratamento: PTX em monoterapia, PTX associado a BRL50481 400 μM e o pré-tratamento com BRL50481 400 μM seguido de tratamento com associação de PTX e BRL 50481 400 μM por 24h (A) e 48 h (B). Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Interessados em avaliar se o efeito na VCM seria mantido utilizando menores concentrações de PTX, foi realizado o pré-tratamento das células da linhagem OVCAR3 com BRL50481 400 μM por 24h, seguido do tratamento de BRL50481 400 μM combinado com PTX nas concentrações de 5 μM a 5×10^{-4} nM em 24h de tratamento. Conforme observado na FIGURA 22, o pré-tratamento de células de OVCAR3 com BRL50481 400 μM proporcionou redução na VCM das células em aproximadamente 20% quando comparado ao tratamento em monoterapia com PTX na concentração de 5×10^{-3} nM ($p < 0,001$), concentração em que 90% das células se mantêm metabolicamente ativas. Assim, o pré-tratamento com BRL50481 possibilitou a redução da concentração do taxano em cerca de $80,4 \times 10^3$ vezes.

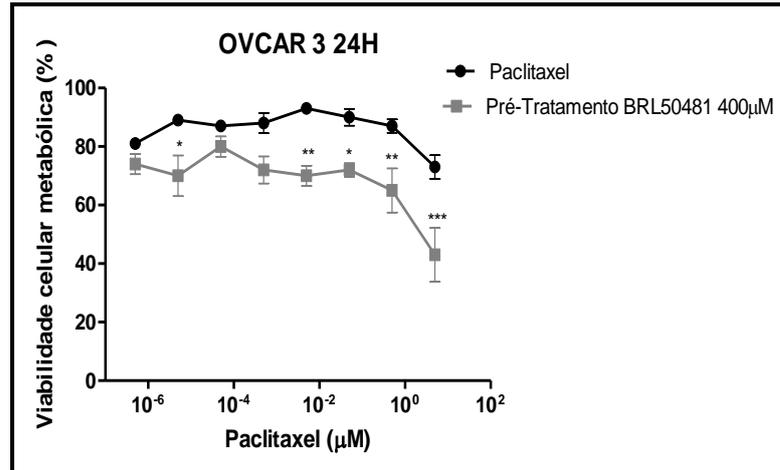


Figura 22: Efeito do pré-tratamento de BRL50481 associado com baixas concentrações de PTX na VCM pelo método de MTT em OVCAR3.

Células da linhagem OVCAR3 foram tratadas com PTX na faixa de concentração de 5 µM a 5x10⁻⁷ µM em monoterapia e pré-tratadas com BRL50481 400 µM e, em seguida, tratadas com PTX associado à BRL50481 400 µM por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Para cada experimento foram realizadas quatro réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,001.

Dessa forma, o efeito na VCM da combinação do inibidor de PDE7 com PTX apresentou ser dependente do tempo de tratamento em ambas as linhagens analisadas, sendo que o tempo de 24h apresentou maiores benefícios para o tratamento *in vitro*. Ademais, nossos dados mostraram a importância da cronologia no tratamento de CAOv no regime de associação do inibidor de PDE7 e PTX proposto em ambas linhagens estudadas. Além disso, a cronologia do tratamento permitiu reduzir a concentração de PTX empregado, o que possibilita prospectar menor toxicidade para as pacientes que apresentam recidiva ao tratamento padrão com CISP e que podem se beneficiar do tratamento com PTX.

O agente antineoplásico PTX é um composto estabilizador de microtúbulos que tem como função promover a parada do ciclo celular na fase G2/M e induzir a apoptose. Um estudo conduzido por SRIVASTAVA et al. (1998) em linhagens celulares de câncer de mama, MCF-7 e MDAMB-231, mostrou que os quimioterápicos que causam danos aos microtúbulos como PTX, vincristina e vinblastina promovem apoptose devido ao bloqueio do crescimento na fase G2/M do ciclo celular, à indução de caspase 3, bem como à degradação da Poli ADP-Ribose Polimerase 1 (PARP). Além disso, os fármacos lesivos aos microtúbulos levaram à hiperfosforilação de Bcl-2 por meio da PKA.

Embora não se tenha mensurado a atividade de PKA e, buscando a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos da associação de BRL50481 com PTX, uma hipótese que pode ser formulada engloba a maior atividade da enzima PKA promovida tanto pelo uso do inibidor de PDE7 bem como pelo quimioterápico PTX, resultando na diminuição da VCM em ambas as linhagens de CAO.V.

Dessa forma, devido a maior eficácia da associação do inibidor de PDE7 e PTX na diminuição da viabilidade celular metabólica nas linhagens de CAO.V A2780 e OVCAR3 comparado à associação com cisplatina e ao fato do quimioterápico PTX apresentar como um dos principais efeitos adversos a neurotoxicidade, buscou-se elucidar os mecanismos de ação do inibidor de PDE7 combinado ao PTX.

5.6 A INIBIÇÃO DE PDE7 NÃO AFETA A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

Avaliamos o efeito da inibição de PDE7 na progressão do ciclo celular por meio da utilização do inibidor seletivo BRL50481 em células das linhagens A2780 e OVCAR3 em diferentes condições experimentais descritas na TABELA 5. Conforme observou-se na FIGURA 23, o PTX promoveu parada do ciclo celular em G2/M, um dos mecanismos clássicos de ação desse quimioterápico (RESHKIN *et al.*, 2003), em ambas as linhagens celulares avaliadas. O tratamento das linhagens de CAO.V com o inibidor BRL50481 não alterou o ciclo celular e sua associação com PTX também não impediu a parada do ciclo celular em G2/M das referidas linhagens. Copilando os dados, nota-se que o mecanismo de ação do inibidor não perpassa pela parada no ciclo celular, bem como também não afetou o mecanismo de ação de PTX no ciclo celular nas linhagens celulares estudadas.

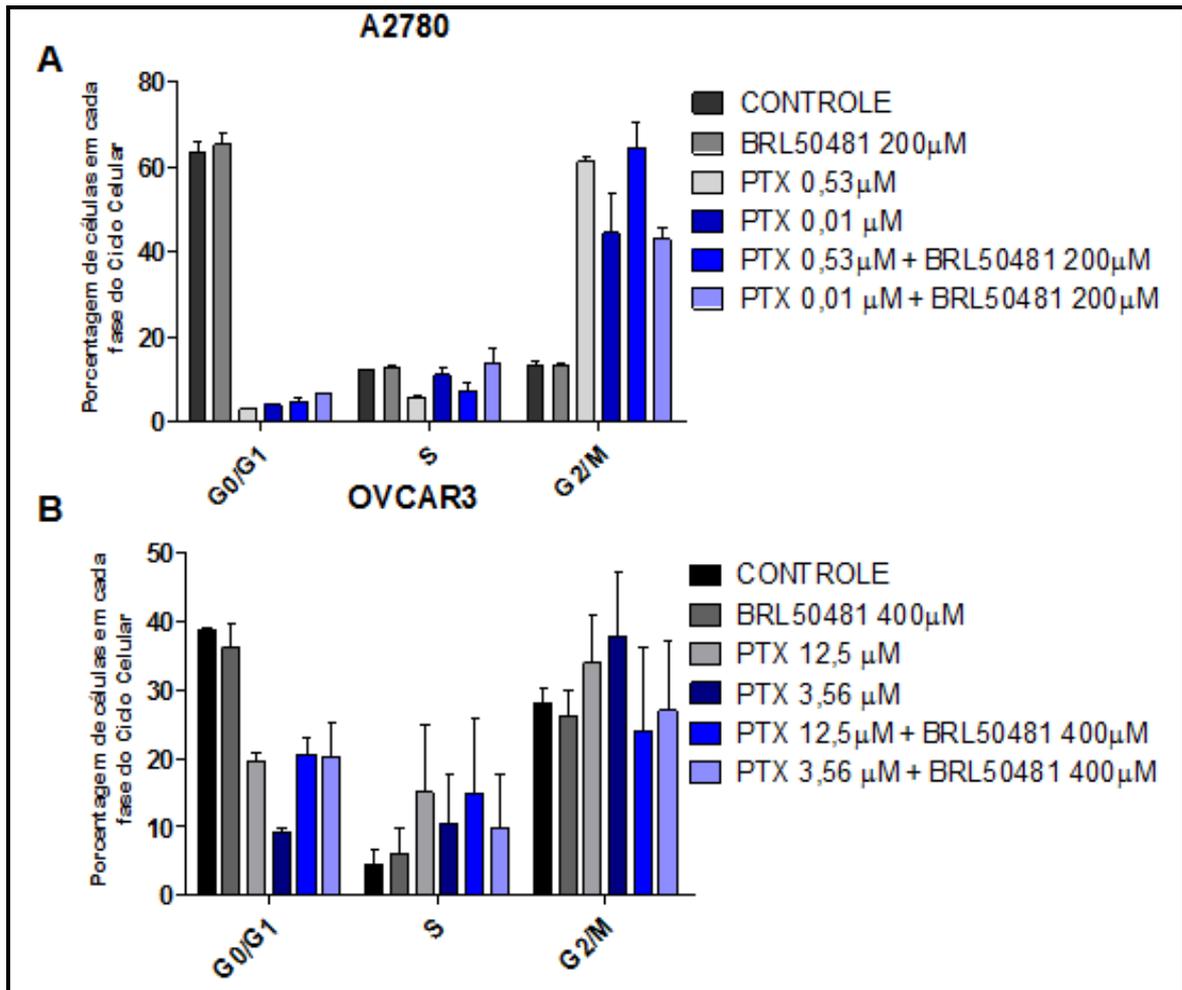


Figura 23: Análise do efeito de BRL50481 no ciclo celular.

As linhagens celulares A2780 (A) e OVCAR3 (B) foram tratadas por 24h com BRL50481 e PTX em mono e politerapia. Os experimentos foram realizados em duplicata (N=2). Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

5.7 COMBINAÇÃO DE BRL50481 E PTX PROMOVEU O AUMENTO DA NECROSE CELULAR NA LINHAGEM OVCAR3

As células das linhagens CAOV A2780 e OVCAR3 foram submetidas ao ensaio de indução de apoptose na presença e na ausência das drogas BRL50481 e PTX usando o ensaio de Anexina V/IP por citometria de fluxo. Não foi observado alterações na indução de apoptose e necrose na linhagem A2780 após 24 h tratamento com os quimioterápicos BRL50481 (200 μ M), PTX (0,53 μ M e 1×10^{-7} nM) e associação de BRL50481 (200 μ M) e PTX (0,53 μ M) (FIGURA 24F).

Conforme se observa na FIGURA 25F, na linhagem OVCAR3 a associação de BRL50481 (400 μ M) e PTX (12,5 μ M) promoveu um aumento na porcentagem de

células em necrose, comparado aos demais tratamentos e ao controle tratado apenas com DMSO (diluente de BRL50481).

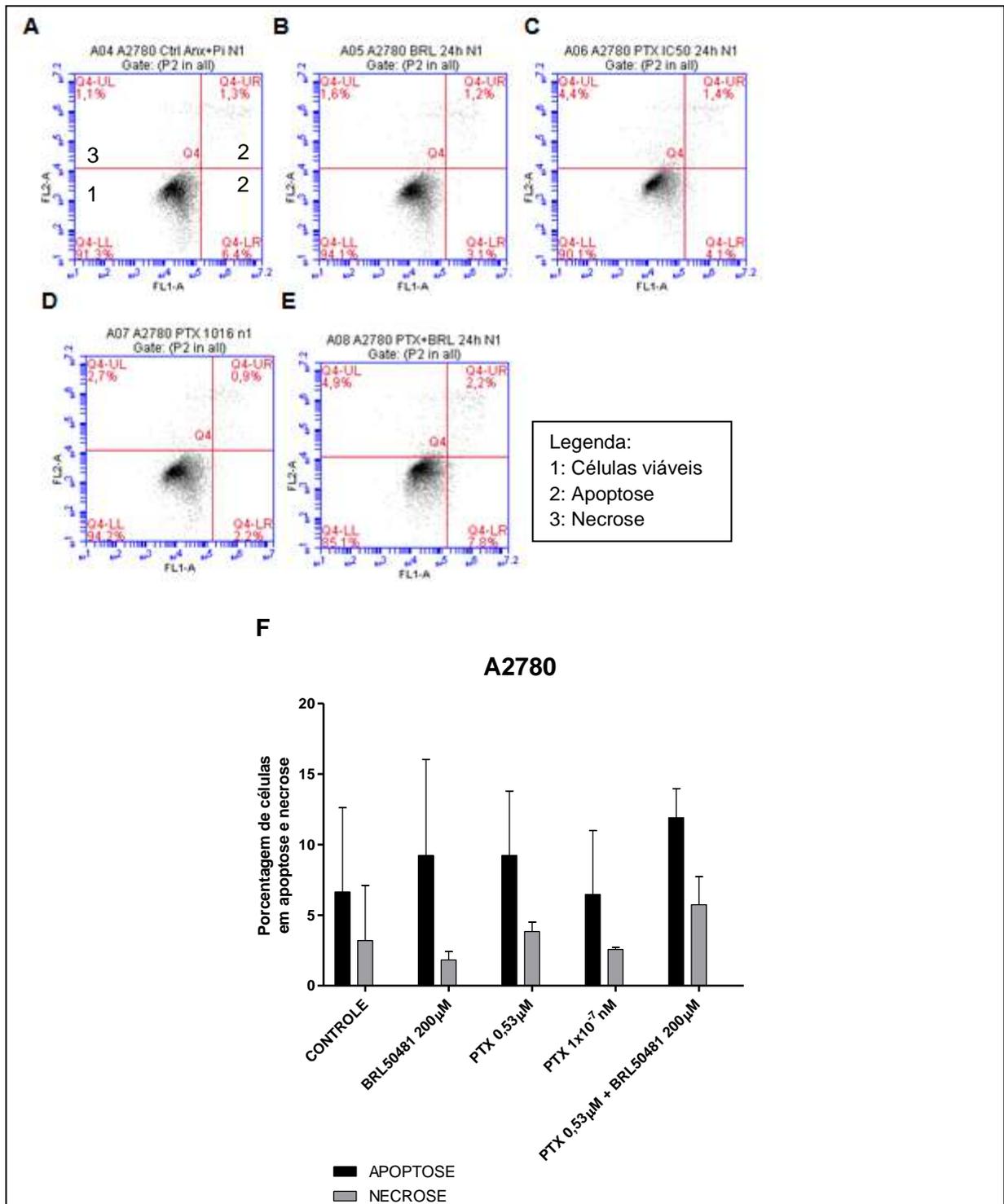


Figura 24: Ensaio de indução de apoptose utilizando Anexina V/IP na linhagem A2780. Células da linhagens A2780 foram tratadas com (A) DMSO, (B) 200 de μ M BRL50481, (C) PTX na IC_{50} , (D) PTX 1×10^{-7} nM e (E) 200 de μ M BRL50481 e 1×10^{-7} nM PTX em politerapia, por 24 h (F) células em apoptose e necrose representadas graficamente. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Figura representativa de um experimento. Análise estatística: Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni.

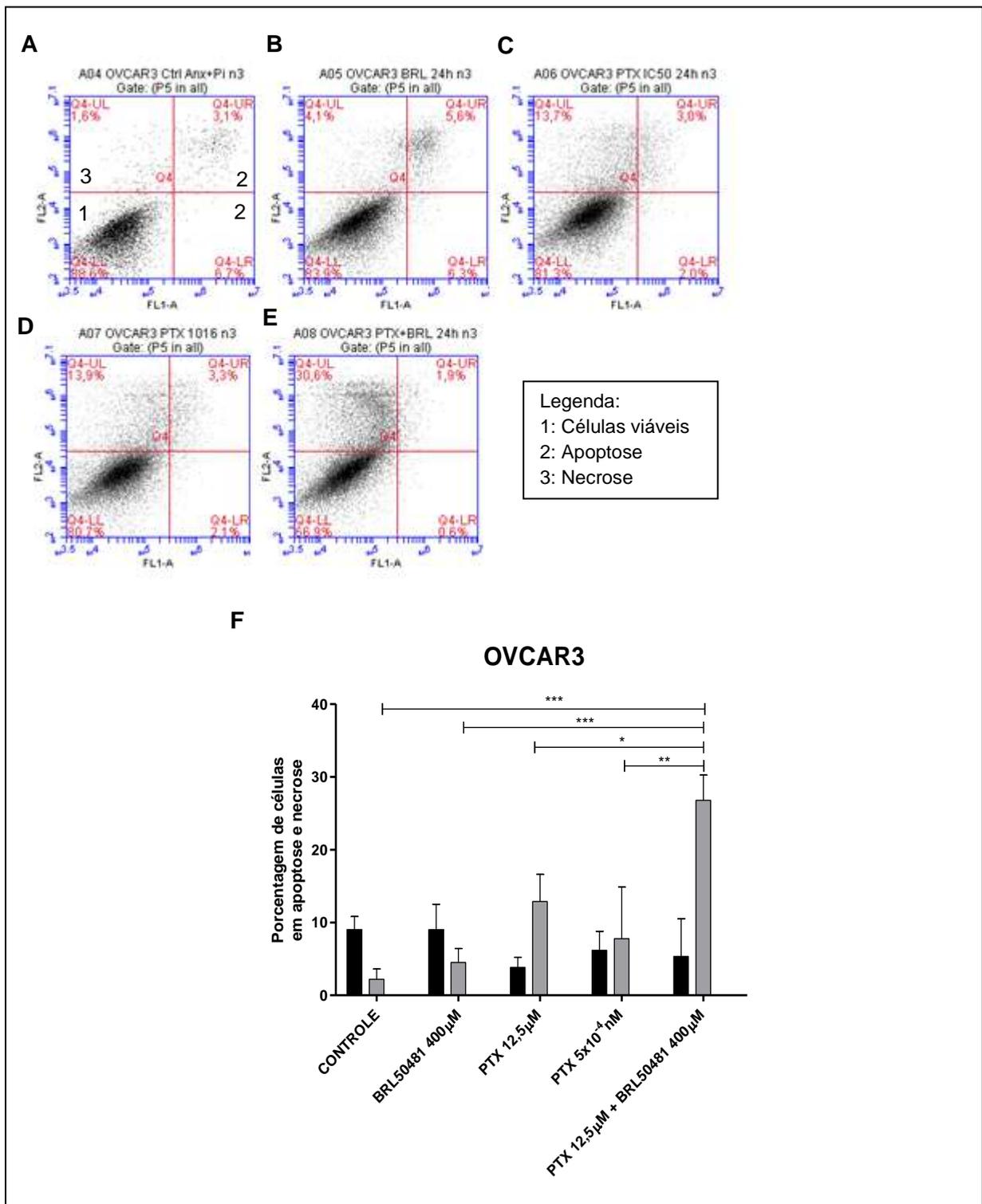


Figura 25: Ensaio de indução de apoptose utilizando Anexina V/IP na linhagem OVCAR3. Células da linhagem OVCAR3 foram tratadas com (A) DMSO, (B) 400 µM de BRL50481, (C) PTX na IC₅₀, (D) PTX 5x10⁻⁴n e (E) 400 de µM BRL50481 e 5x10⁻⁴nM PTX em politerapia, por 24h (F) células em apoptose e necrose representadas graficamente. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Figura representativa de um experimento. Análise estatística: Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,001

Nos tecidos, a homeostase depende do equilíbrio entre a proliferação celular e a remoção das células por morte celular programada. A incapacidade de remover as células indesejadas e danificadas pode levar a várias doenças como o câncer. Existem diferentes vias de morte celular (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). A apoptose é caracterizada por uma série de alterações morfológicas, incluindo retração celular, bolha plasmocitária, condensação nuclear e fragmentação e a formação de corpos apoptóticos (ELMORE, 2007). Diferentemente, a necrose é morfológicamente caracterizada por um ganho no volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e subsequente perda de conteúdo intracelular. Durante muito tempo, a necrose foi considerada como uma forma acidental descontrolada de morte celular, mas há evidências que a morte celular necrótica pode ser finamente regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

As características fundamentais da necrose incluem a depleção de energia celular, danos aos lipídeos de membrana e perda da função dos canais de íons homeostáticos. Ao contrário da apoptose, em que a família das proteínas Bcl-2 e caspases desempenham papéis fundamentais, a necrose é induzida pela inibição da produção de energia celular, desequilíbrio do fluxo de cálcio intracelular, geração de ROS e ativação de proteases não-apoptóticas. Estes eventos, muitas vezes, se potencializam e são sinérgicos causando necrose (STACEY RICCI; ZONG, 2006). Ao contrário da apoptose, a necrose provoca uma resposta inflamatória. Esta resposta pode ajudar a recrutar células imunes citotóxicas para a área tumoral, aumentando, assim, a eficácia dos quimioterápicos (STACEY RICCI; ZONG, 2006; ZHOU *et al.*, 2004).

Dessa forma, observou-se no ensaio de indução de apoptose por Anexina/IP o aumento da morte celular por necrose nas células tratadas com associação de PTX e inibidor de PDE7 na linhagem OVCAR3. Conforme dados da literatura, a indução de necrose promove uma resposta inflamatória (ESCOBAR-SÁNCHEZ; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2015). Ademais, os nossos experimentos de análise da expressão gênica da citocina pró-inflamatória IL-6, bem como análise da secreção da mesma no sobrenadante após o pré-tratamento das células OVCAR3 com BRL50481 e posterior associação de BRL50481 e PTX mostraram aumentos nos níveis de

ambos (Item 5.8 e 5.9), indicando que o processo inflamatório pode atuar como supressor tumoral ao recrutar células do sistema imune.

5.8 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM LINHAGENS DE CAO V

Os níveis dos transcritos das citocinas IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , CXCL-2 e gp130 foram avaliados nas linhagens A2780 e OVCAR3.

Na linhagem A2780, o pré-tratamento com 200 μ M de BRL50481 seguido do tratamento combinado com 200 μ M de BRL50481 e 1×10^{-7} nM de PTX promoveu aumento da expressão do transcrito gp130 em torno de 4 vezes comparado ao controle ($p < 0,5$) (FIGURA 26B). A mesma condição avaliada também proporcionou o aumento de duas vezes na expressão do transcrito da interleucina IL-1 α em relação ao controle e ao tratamento com PTX em monoterapia (FIGURA 26C) ($p < 0,5$).

Já na linhagem OVCAR3, o pré-tratamento com 400 μ M BRL50481 seguido do tratamento combinado de 400 μ M BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX aumentou a expressão da interleucina IL-6 em torno de 4,5 vezes quando comparado ao tratamento em monoterapia com 400 μ M de BRL50481 ($p < 0,5$) (FIGURA 27A). No entanto, o mesmo não foi observado para a IL-1 α . O pré-tratamento, bem como o tratamento em monoterapia empregando 400 μ M BRL50481 reduziu a expressão deste transcrito em relação ao controle ($p < 0,5$). Já o tratamento com 5×10^{-4} nM de PTX proporcionou aumento da expressão deste transcrito em comparação com os tratamentos com BRL50481 em monoterapia e ao pré-tratamento ($p < 0,01$) (FIGURA 27C).

O mesmo foi observado para a interleucina IL-1 β . O pré-tratamento com 400 μ M BRL50481 seguido do tratamento combinado de 400 μ M BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX reduziu a expressão deste transcrito em relação às demais condições de tratamento ($p < 0,5$) (FIGURA 27D). O mesmo ainda promoveu o aumento da expressão de CXCL-2 comparado aos demais tratamentos (FIGURA 27F).

As citocinas são responsáveis por processos fisiológicos que são fortemente correlacionados com tumorigênese e a formação de metástase. Estes processos incluem inflamação (HANSSON, 2005), migração celular (MOSER *et al.* 2004), angiogênese (BELPERIO *et al.* 2000) e apoptose (JANES *et al.* 2005).

Adicionalmente, as citocinas secretadas pelas células cancerosas e o estroma associado desempenham um papel fundamental nos mecanismos de resistência aos medicamentos (VISSER; JONKERS, 2009).

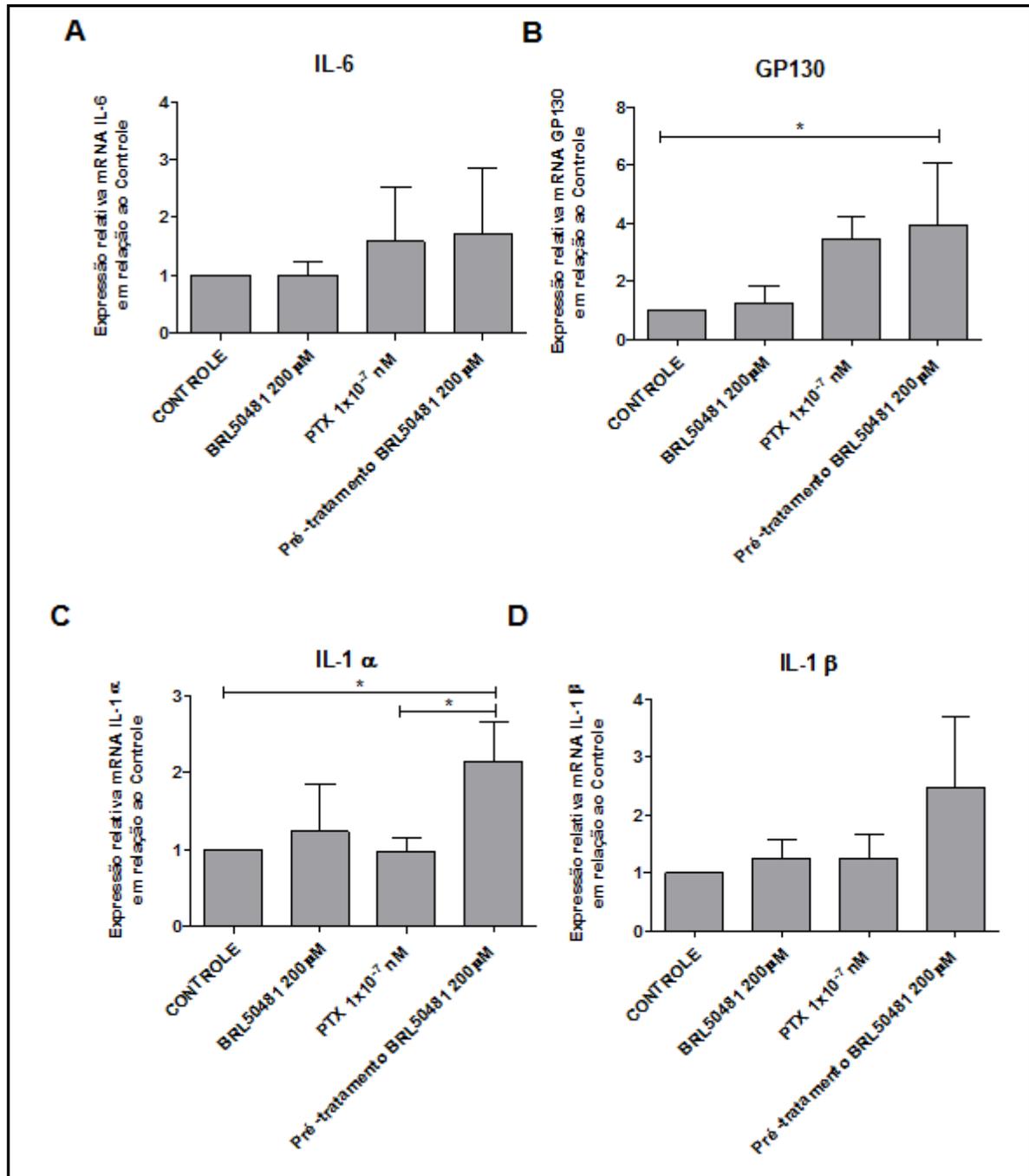
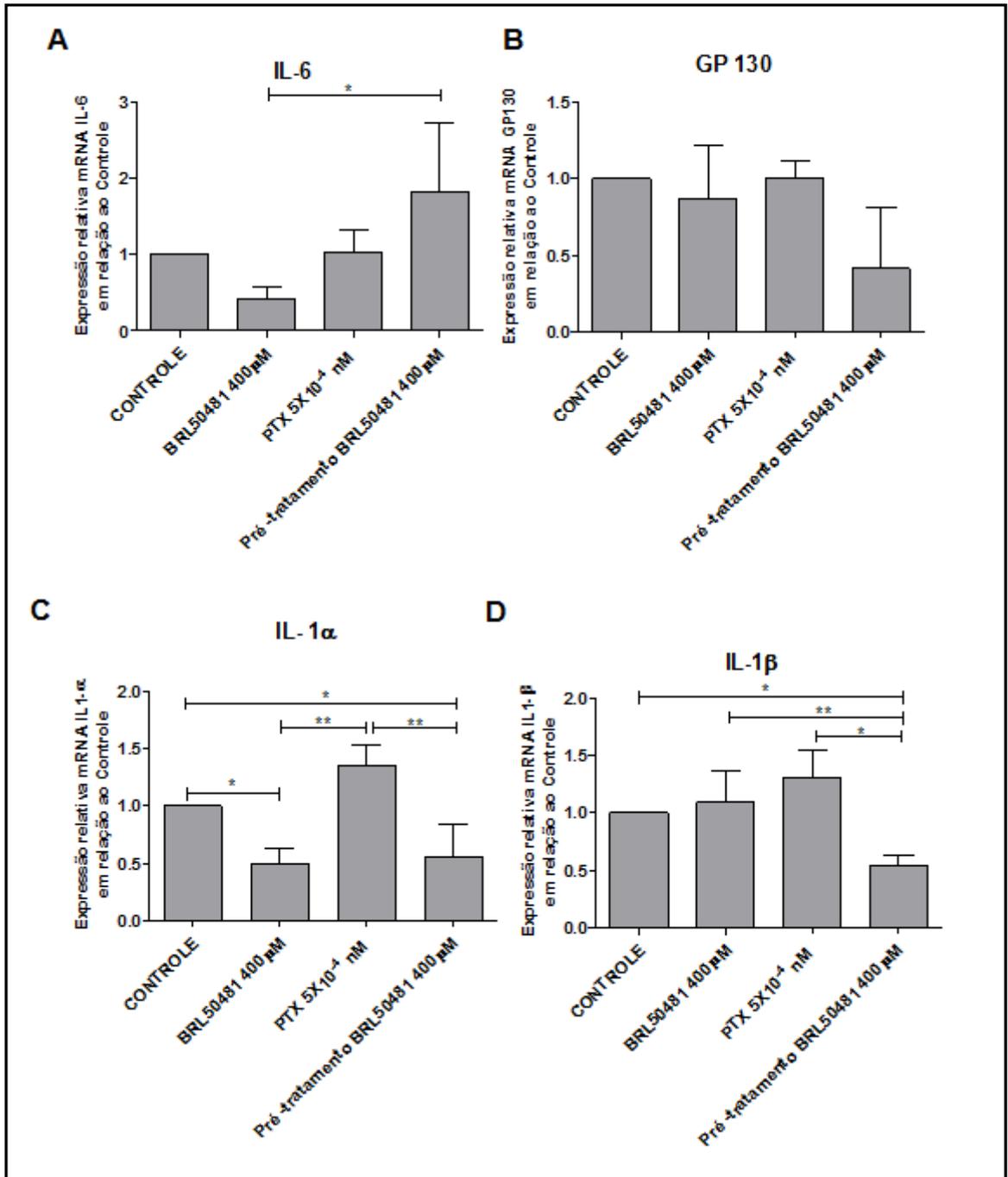


Figura 26: Análise da expressão gênica das citocinas na linhagem A2780.

As células da linhagem A2780 foram tratadas com 200 μM BRL50481, 1x10⁻⁷nM de PTX e pré-tratadas com 200 μM BRL50481 seguido do tratamento de combinação com 200 μM BRL50481 e 1x10⁻⁷nM de PTX, por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata mecânica. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. *p<0,5



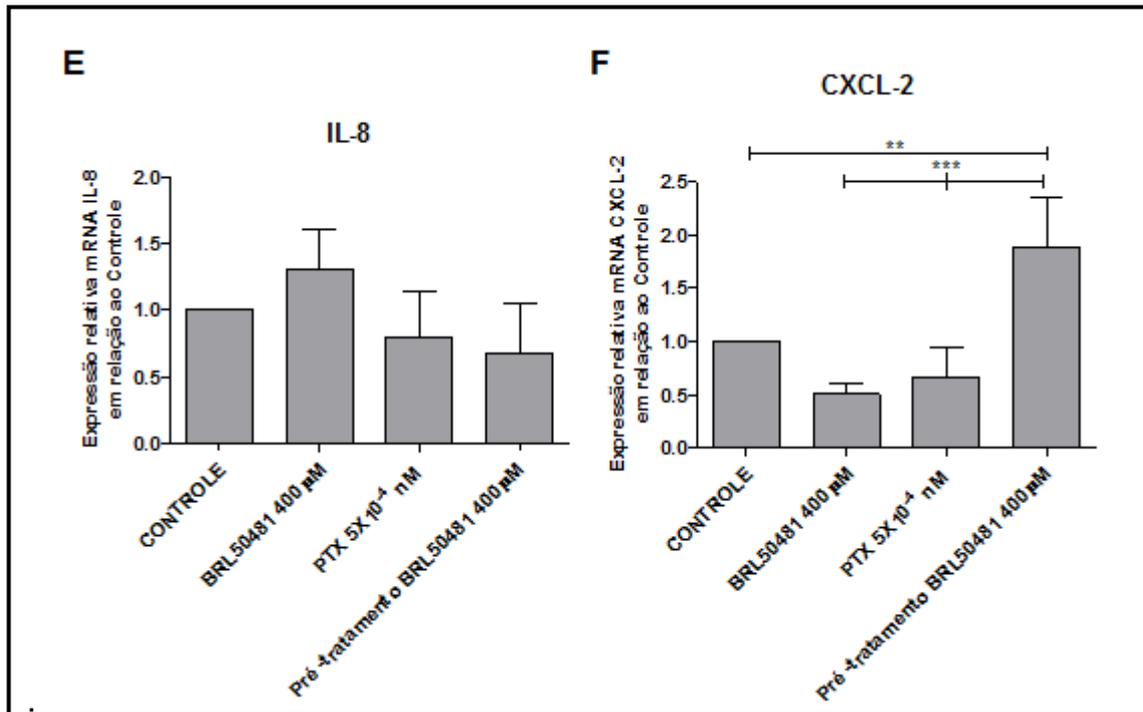


Figura 27: Análise da expressão gênica das citocinas na linhagem OVCAR3.

As células da linhagem OVCAR3 foram tratadas com 400 µM BRL50481, 5x10⁻⁴nM de PTX e pré-tratadas com 400 µM BRL50481 seguido do tratamento com 400 µM BRL50481 e 5x10⁻⁴nM de PTX, por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata mecânica. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. *p<0,5; ** p<0,01

A IL-6 é uma citocina pleiotrófica e atua no sistema imunológico em resposta a lesões e infecções, bem como na inflamação (WANG *et al.*, 2010). Esta interleucina é produzida pelas células T, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (VAN DER ZEE *et al.*, 1995) e pode desempenhar um papel tanto pró-inflamatório quanto anti-inflamatório, dependendo do modelo experimental (TILG *et al.* 1997). Esta desempenha um importante papel em diversos tipos tumorais incluindo a migração celular, a invasão, o crescimento, a proliferação, a apoptose, a angiogênese e a diferenciação (SANTER *et al.*, 2010; SUCHI *et al.*, 2011). Vale ainda ressaltar que o elevado nível sérico de IL-6 tem sido correlacionado a um prognóstico ruim em pacientes com diferentes tipos de câncer, incluindo mieloma múltiplo (LUDWIG *et al.*, 1991), linfoma (SEYMOUR *et al.*, 1995), CAOV (BEREK *et al.*, 1991), câncer de próstata (TWILLIE *et al.*, 1995) e de células renais metastáticas (BLAY *et al.*, 1992)

A ligação da citocina IL-6 ao receptor IL-6R α não conduz inicialmente à sinalização celular. O complexo de IL-6 e IL-6R associam-se com a proteína glicoproteína gp130

induzindo-a dimerização e iniciando a sinalização intracelular via JAK/STAT (Janus cinase/Proteína de transdução de sinal e ativador de transcrição) (HIBI *et al.*, 1990). Além da ativação da via canônica JAK/STAT, a proteína tirosina fosfatase/ sem receptor tipo 11 (SHP-2) é recrutada para fosforilar o resíduo de tirosina em gp130, que por sua vez, fosforila a proteína tirosina cinase JAK1 (JAK1), ativando a via de sinalização de MAPK/ERK (HIRANO *et al.* 1997). Ademais, o aumento da expressão de IL-6R α e a ativação constitutiva da via de STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) também foram encontrados associados à proliferação celular de carcinoma de ovário (SYED *et al.*, 2002). Outro estudo conduzido em células de CAO V demonstrou que a IL-6 secretada pelas células de CAO V era capaz de controlar os sinais da via por meio da modulação dos receptores IL-6R α e gp130, os primeiros elementos da cascata de sinalização ativadas por citocinas. Este trabalho forneceu a primeira evidência que IL-6 pode sensibilizar as próprias células de CAO V por meio do aumento dos níveis dos receptores, amplificando a cascata de sinalização celular. A citocina IL-6 ainda foi capaz de ativar as vias MAPK/ERK e PI3K/AKT, importantes na proliferação e diferenciação celular (WANG, Y *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que os tratamentos empregados na linhagem A2780 não promoveram alteração na expressão de IL-6 em relação ao controle. Esse dado corrobora com diferentes estudos *in vitro* que utilizaram a linhagem A2780 como modelo parental para expressão ectópica de IL-6 (HAO *et al.*, 2014; KAPKA-SKRZYPCZAK *et al.*, 2016; WANG, Y *et al.*, 2012).

No entanto, o aumento da expressão do transcrito na linhagem OVCAR3 após o pré-tratamento com BRL50481 seguido do tratamento associado do inibidor de PDE e PTX, pode estar associado à necrose, visto que a combinação das drogas favoreceu a morte celular por esse mecanismo (FIGURA 23E). Devido à perda da integridade da membrana celular, as células necróticas libertam passivamente vários fatores citosólicos que podem ativar células apresentadoras de antígenos e outras células do sistema imune, além de aumentar a secreção da citocina IL-6 (VANDEN BERGHE *et al.*, 2006).

Ademais, observou-se na FIGURA 25B que as células tratadas com 400 μ M de BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX, ambos em monoterapia, e o pré-tratamento com

400 μM BRL50481 seguido do tratamento com 400 μM de BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX não apresentaram alteração na expressão de gp130. Esse receptor integra parte de um complexo de sinalização de receptores de pelo menos oito citocinas, dentre elas, IL-6, IL-11 e IL-27 (XU *et al.*, 2013). Embora as células da linhagem OVCAR3 tenham apresentando a nível transcricional uma modulação positiva da expressão de IL-6 não foi observada alteração na expressão de um dos receptores para esta citocina, o que pode indicar que a via de sinalização celular modulada por IL-6 não se encontra ativa.

Já na linhagem A2780, o pré-tratamento das células com 200 μM de BRL50481 seguido do tratamento com 200 μM de BRL50481 e 1×10^{-7} nM de PTX modulou positivamente a expressão de gp130. Para melhor compreender a função desempenhada por esse receptor na linhagem A2780 será necessário analisar importantes moléculas que participam dessa cascata de sinalização como a expressão do receptor IL-6R α e STAT3, visto que as células desta linhagem apresentam apenas produção endógena da citocina IL-6. Ainda, a subunidade gp130 do receptor não apresenta afinidade para IL-6 ou IL-6R α sozinhos. Somente o complexo IL-6 e IL-6R α pode se ligar a gp130 expresso nas células (ROSE-JOHN, 2012; TAGA *et al.*, 1989).

Alternativamente para determinar se a via JAK/STAT está ativa, além de verificar importantes alvos da cascata de sinalização de IL-6, pode-se também verificar a expressão do supressor de citocina de sinalização 3 (SOCS3), uma molécula que inibe a sinalização mediada por IL-6 pela mecanismo de retroalimentação negativa (GRIVENNIKOV; KARIN, 2008; SOMMER *et al.*, 2005).

Outra importante interleucina avaliada no estudo foi IL-1. Níveis elevados desta citocina são encontrados em modelos tumorais experimentais e em neoplasias humanas. Esta citocina exerce seus efeitos proliferativos e angiogênicos no microambiente tumoral, principalmente através da interação com células estromais, inflamatórias e malignas, estimulando a proliferação e invasão de células tumorais por meios autócrinos ou parácrinos (NALDINI *et al.*, 2010).

A IL-1 β é produzida por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células epidérmicas em resposta aos estímulos. Esta citocina é sintetizada como uma proteína precursora 31 kDa e clivada pela caspase-1 em sua forma ativa

madura de 17 kDa (DINARELLO, 1996) (FIGURA 28). A produção constitutiva de IL-1 β por células de carcinoma do ovário (LEWIS *et al.*, 2006) aumenta a capacidade invasiva das mesmas por meio do aumento da expressão de MMP-1 (DENKERT *et al.*, 2003) e pelo estímulo da produção de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento endotelial (VEGF) (STADLMANN *et al.*, 2005).

Já a IL-1 α é sintetizada na forma precursora como uma proteína de 31 kDa. Esta é clivada pela protease dependente de Ca⁺² denominada calpaína na forma ativa madura associada às células (APTE *et al.*, 2006). A IL-1 α é produzida por monócitos, macrófagos, células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos (COHEN *et al.*, 2010). No entanto, esta citocina permanece principalmente associada às células e, portanto, induz menos a inflamação e angiogênese do que IL-1 β (CARMI *et al.*, 2009) (FIGURA 28).

Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com inibidor de PDE7 na linhagem A2780 favoreceu o aumento da expressão gênica de IL-1 α (FIGURA 27C), o que mostra a importância dessa citocina na diminuição da sobrevivência celular. Assim, na forma associada às células, a IL-1 α pode atuar principalmente como um supressor tumoral em células malignas, recrutando células imunocompetentes para o microambiente tumoral e auxiliando na resposta imunológica para combater o crescimento tumoral (APTE *et al.*, 2006; DINARELLO, 2010).

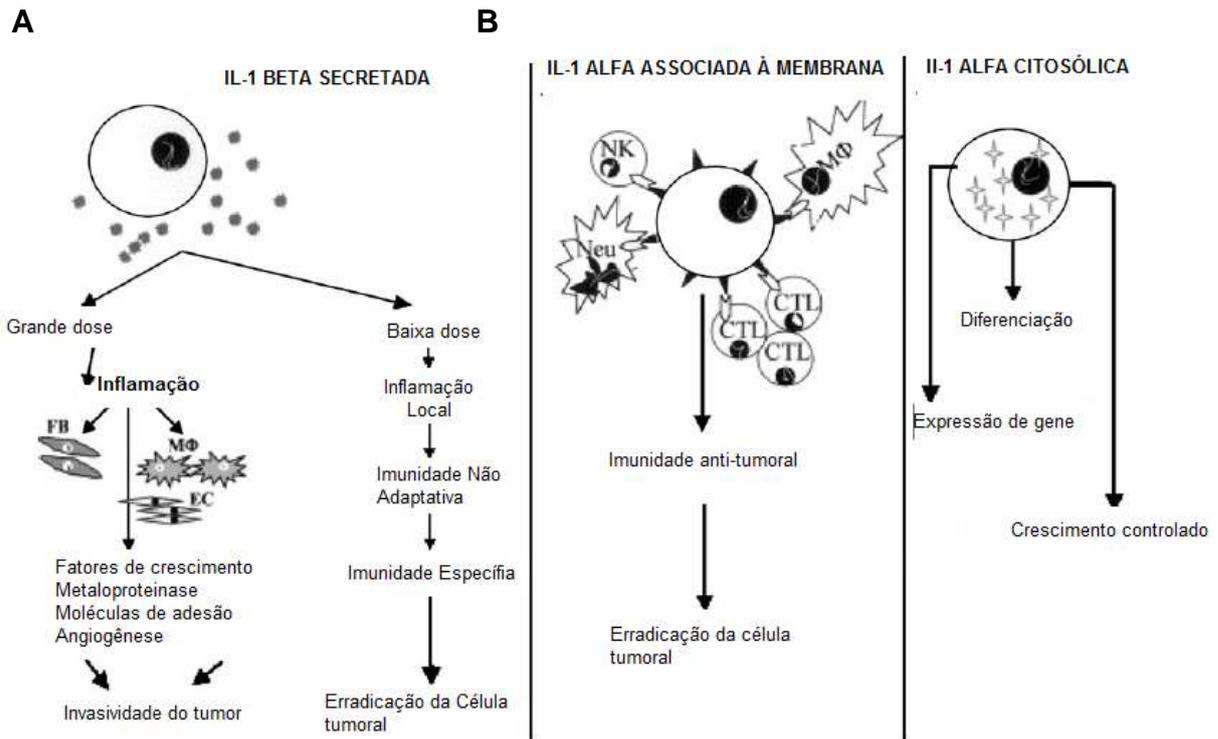


Figura 28: Padrões de expressão de IL-1 em células tumorais e suas possíveis ações na malignidade tumoral.

(A) A citocina pró-inflamatória IL-1 β é secretada no microambiente apenas após o processamento através de caspase-1. (B) As células também podem expressar o precursor de IL-1 α citosólica ou associada a membrana. Adaptado de APTE *et al.*, 2006.

O mesmo não foi observado para a linhagem OVCAR3. Tanto o tratamento com BRL50481 em monoterapia quanto o pré-tratamento diminuíram a expressão gênica de IL-1 α . Em contrapartida, o pré-tratamento com inibidor de PDE7 também promoveu a diminuição da expressão gênica de IL-1 β . Dados da literatura mostraram que no CAOV esta citocina está associada à invasividade, à angiogênese e à progressão tumoral (DINARELLO, 2006; SCHAUER *et al.*, 2013; WATANABE *et al.*, 2012). Além disso, a IL-1 β tem sido considerada como a principal molécula pró-inflamatória. Em locais de baixa produção, a mesma induz uma resposta inflamatória limitada seguida pela ativação de mecanismos imune específicos, enquanto que, quando presente em altas doses, induz uma ampla inflamação acompanhada de dano tecidual e supressão imune (VORONOV *et al.*, 2013) (FIGURA 28).

Ademais, algumas quimiocinas podem induzir efeitos pró-angiogênicos, levando a tumores altamente neovascularizados e ao aumento da formação de metástase. Diversos estudos mostram as quimiocinas, principalmente as dos subgrupos CXC e CC, são importantes reguladores da angiogênese tumoral promovendo migração e proliferação de células endoteliais. Um estudo conduzido por SON *et al.* (2012) na

linhagem OVCAR3 mostrou alta expressão das citocinas CXCL-1, CXCL-2 e CXCL-8, enquanto a linhagem A2780 não expressou ou expressou baixos níveis das mesmas. As quimiocinas interagem com proteínas G específicas acopladas a receptores e ativam vias de sinalização em células normais e cancerosas. Em células normais, após ativação do receptor CXCR4 pela citocina CXCL-12 ocorre a dimerização do mesmo e a ativação das proteínas Gi/Go, incluindo os sinais mediados por G α e G $\beta\gamma$. A ativação de G α_i implica na inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüente diminuição da concentração citosólica de cAMP, conduzindo à inibição da PKA (BARBIERI *et al.* 2010).

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento da linhagem OVCAR3 com 400 μ M de BRL50481 e posterior associação 400 μ M de BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX aumentou a expressão de CXCL-2. Dessa forma, para entender o exato mecanismo envolvido será necessário investigar expressão do receptor de CXCL-2, bem como a atividade de PKA. Assim, poderemos verificar como o aumento da expressão dessa quimiocina está regulando a referida via.

Outra importante citocina pró-inflamatória é IL-8. Estudos mostram que a mesma se encontra elevada no fluido do cisto ovariano, soro e tecido tumoral de pacientes com CAOV e o aumento da expressão de IL-8 está correlacionado com o prognóstico ruim (WANG, *et al.*, 2012). Ademais, um estudo conduzido por WANG *et al.* (2005) mostrou que IL-6 e IL-8 podem promover a proliferação celular nas linhagens de CAOV-3 e OVCAR3 de modo tempo e dose-dependentes. Ainda, a superexpressão de IL-8 na linhagem A2780, que não expressam esta citocina, aumentou o crescimento independente de ancoragem, a proliferação, o potencial angiogênico, a adesão e a invasão celular (WANG *et al.*, 2012).

Nossos dados mostraram que os tratamentos não alteraram a expressão gênica dessa citocina na linhagem OVCAR3. E não foi possível amplificar a mesma na linhagem A2780, corroborando com os dados da literatura (WANG *et al.*, 2012).

5.9 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS DE CAOV

Realizou-se ainda a dosagem de duas importantes citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-1 β , no sobrenadante das células A2780 e OVCAR3 após os tratamentos conforme indicado na TABELA 5. Em relação à dosagem da citocina IL-6, não foi

possível detectar a presença da mesma no sobrenadante das células da linhagem A2780. Esse dado vem ao encontro aos achados da literatura que demonstram que esta citocina está presente a nível basal na linhagem A2780 (HAO *et al.*, 2014; KAPKA-SKRZYPCZAK *et al.*, 2016; WANG, Y *et al.*, 2012). Embora a análise de expressão gênica de IL-6 detectou o transcrito em todos os tratamentos, a expressão desta citocina na linhagem A2780 pode ser regulada tanto por mecanismo pós-transcricional quanto pós-traducionais.

Já na linhagem OVCAR3, o pré-tratamento com 400 μM de BRL50481 e posterior tratamento combinado com 400 μM de BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX, por 24h, promoveu o aumento da produção e secreção da IL-6 comparado ao controle e ao tratamento em monoterapia com 400 μM de BRL50481 (FIGURA 29). Esse dado corrobora com o resultado obtido da análise da expressão gênica no qual também foi observado aumento da expressão de IL-6 (FIGURA 27A).

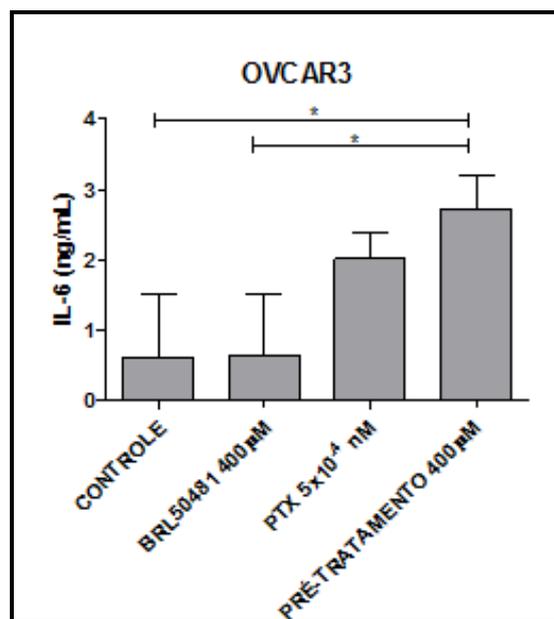


Figura 29: Dosagem da citocina IL-6 nas células da linhagem OVCAR3.

A citocina IL-6 foi quantificada no sobrenadante da cultura celular após tratamento com BRL50481 e PTX, em monoterapia, e o pré-tratamento das mesmas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. Os experimentos foram realizados em triplicata mecânica. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. * $p < 0,5$.

Segundo KRYCZEK *et al.* (2000) a produção de IL-6 no CAOv foi relacionado ao tipo histológico e características biológicas do tumor e pacientes com os subtipos histológicos seroso e mucinoso apresentaram maior atividade de IL-6 comparado

aos subtipos endometrióides e indiferenciados. E de acordo com a classificação histológica do CAO, as linhagens estudadas no nosso estudo A2780 e OVCAR3 apresentam origem etiológica distinta, o que pode contribuir para as diferenças encontradas na produção e secreção de IL-6 (BEAUFORT *et al.*, 2014).

Também não foi possível quantificar a citocina IL-1 β no sobrenadante de ambas as linhagens. Conforme mostrado nos resultados de avaliação da expressão gênica, para a linhagem A2780, os diferentes tratamentos as quais as células foram submetidas não modularam a transcrição dessa molécula. Já para a linhagem OVCAR3, o pré-tratamento com BRL50481 modulou negativamente a expressão da mesma. Embora a análise de expressão gênica de IL-1 β detectou o transcrito em todos os tratamentos, a expressão desta citocina nas linhagens A2780 e OVCAR3 pode ser regulada tanto por mecanismo pós-transcricional quanto pós-traducionais.

Além disso, avaliou-se a produção e secreção das citocinas IL-6 e IL-1 β em apenas um tempo de tratamento. Para a melhor elucidação do papel das mesmas na progressão tumoral faz-se necessário a dosagem curso temporal das mesmas.

5.10 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NA PLASTICIDADE EPITELIAL

As células tumorais podem perder suas características epiteliais e adquirir determinadas propriedades mesenquimais que contribuem para a invasão na matriz extracelular e formação de metástase em um processo denominado Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) (DAVIDSON *et al.* 2012).

Conforme se observa na FIGURA 30B, o pré-tratamento das células da linhagem OVCAR3 com 400 μ M de BRL50481 seguido do tratamento combinado com 400 μ M de BRL50481 e 5×10^{-4} nM PTX promoveu a diminuição da expressão do marcador vimentina comparado ao tratamento apenas com 5×10^{-4} nM PTX. No entanto, nenhuma alteração na expressão do mesmo foi observada na linhagem A2780 (FIGURA 30A). O fenômeno TEM é acompanhado de alterações na expressão de um grande número de moléculas, dentre elas, maior expressão do marcador vimentina. Dessa forma, pode-se inferir que o pré-tratamento com o inibidor de PDE7 diminuiu a expressão gênica de vimentina, o que desfavorece a aquisição do fenótipo mesenquimal, contribuindo para diminuição da invasividade e formação de metástase.

Classicamente os marcadores mesenquimais podem ser encontrados superexpressos no processo de TEM, incluindo Snail, SLUG, TWIST, Homeobox 1 ligação E-box Dedo Zinco (Zeb1), Zeb2, N-caderina e fibronectina. Já os marcadores epiteliais (E-caderina, citoqueratinas, ZO-1, claudinas 3 e 4) apresentam expressão reduzida (KALLURI; WEINBERG, 2009; THIERY *et al.*, 2009). Estes marcadores podem ser avaliados para o melhor entendimento do papel da PDE7 no fenótipo supracitado.

Interessantemente, existem poucas evidências que células do CAOv sofram TEM completa. Além disso, o CAOv seroso, o tipo histológico da linhagem OVCAR3, frequentemente expressa marcadores relacionados à TEM, como a N-caderina e a vimentina, o que mostra sua estreita relação histogenética com o mesotélio (DAVIDSON *et al.* 2012).

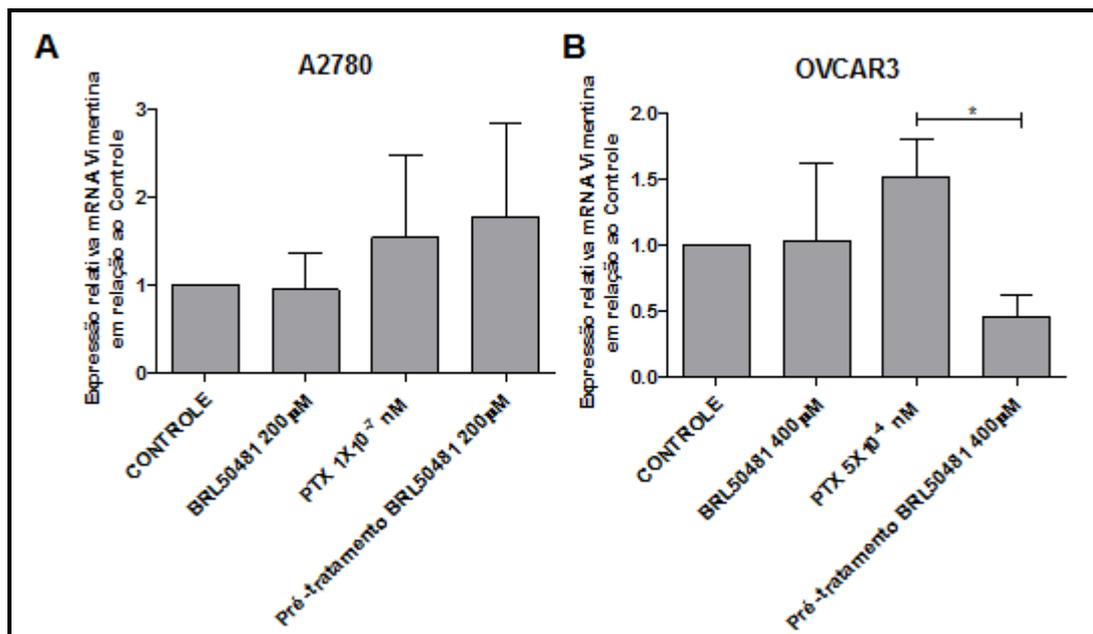


Figura 30: Análise da expressão do marcador vimentina no fenótipo TEM.

Células das linhagens (A) A2780 e (B) OVCAR3 foram tratadas com BRL50481 e PTX, em monoterapia, e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. Os experimentos foram realizados em duplicata mecânica. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,5$.

5.11 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NO FENÓTIPO DE CTT NAS CÉLULAS DE CAO V A2780 E OVCAR3

Embora a desdiferenciação celular seja possível em condições muito específicas, o processo normalmente ocorre no sentido de célula-tronco para células diferenciadas. Em contrapartida, as células tumorais não desempenham uma função fisiológica e, portanto, a definição de diferenciação de células tumorais depende apenas de características morfológicas limitadas ou da expressão de alguns marcadores de diferenciação que são compartilhados com as células normais. Do mesmo modo, as células-tronco tumorais (CTT) são células que compartilham de certos marcadores com células-tronco normais e podem originar células tumorais diferenciadas (ALISON *et al.*, 2012; QUINTANA *et al.*, 2010).

A presença dos marcadores de CTT, o fator transcricional ligante de octâmero 4 (OCT4) e o homeobox Nanog (NANOG), nas linhagens A2780 e OVCAR3 foi avaliado por qPCR. Não foi observado alteração na expressão dos dois marcadores na linhagem A2780 (FIGURA 31A e B). No entanto, na linhagem OVCAR3, o pré-tratamento com 400 μ M de BRL50481 seguido do tratamento com 400 μ M de BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX, promoveu diminuição da expressão de OCT4 em comparação ao controle ($p < 0,01$) e ao tratamento com o inibidor de PDE7 em monoterapia ($p < 0,5$) (FIGURA 31D). Também observou-se uma tendência na redução da expressão do marcador NANOG após o pré-tratamento das células de OVCAR3 com 400 μ M de BRL50481 seguido do tratamento com 400 μ M de BRL50481 e 5×10^{-4} nM de PTX (FIGURA 31C).

OCT4 é um importante fator de transcrição durante a embriogênese, sendo essencial para geração de células pluripotentes induzidas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Além disso, é necessário um fino ajuste dos seus níveis para a manutenção da pluripotência, uma vez que alta ou baixa expressão pode induzir diferenciação (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2002).

Em CAO V, a coexpressão do antígeno CD44 (CD44), do receptor do fator de crescimento de epiderme (C-erbB1), do proto-oncogene Met/receptor tirosina cinase (c-Met), de NANOG e de OCT4 é utilizada para enriquecimento de células indiferenciadas. Já no câncer de próstata, a combinação de CD44 e OCT4 é utilizada para o isolamento de células indiferenciadas, as quais apresentam alta

capacidade de iniciação tumoral (YI *et al.*, 2013). Além disso, a maior expressão dos marcadores OCT4 e NANOG também foi associada com a tumorigênese pancreática e o silenciamento de ambos os genes resultou na diminuição da proliferação, migração, invasão, quimiorresistência e progressão tumoral *in vitro* e *in vivo* (BOER *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2009).

Igualmente, TSAI *et al.* (2014) demonstraram que a superexpressão de OCT4 em carcinoma escamoso de células orais resultou no favorecimento do padrão de TEM, com o aumento da expressão de marcadores mesenquimais SLUG e N-caderina. Dessa forma, o papel de OCT4 juntamente com o fenótipo TEM têm estimulado um enorme interesse no campo da pesquisa do câncer, indicando que a presença de CTT contribui para a formação de metástase e recidiva tumoral.

Além disso, outros trabalhos já demonstraram que silenciamento de OCT4 aumentou a sensibilidade à cisplatina e a irradiação nas linhagens celulares de câncer de pulmão e ovário, além de promover o aumento da sensibilidade à temozolomida em células de glioma (CHEN *et al.*, 2008; SAMARDZIJA *et al.*, 2015).

Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com 400 μM de BRL50481 seguido do tratamento com 5×10^{-4} nM de PTX e 400 μM de BRL50481, além de promover diminuição da expressão de um marcador clássico de CTT, também reduziu a expressão do transcrito de vimentina (marcador de EMT) indicando que o mecanismo de ação do inibidor de PDE7 perpassa pela modulação desse importantes fenótipos.

Para um melhor entendimento desse complexo fenótipo na tumorigênese ovariana após a inibição da PDE7, a expressão gênica de outros marcadores de CTT também pode ser avaliada como o antígeno 133 (CD133), o fator transcricional SOX2, e a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e CD44 (BEIER *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2015).

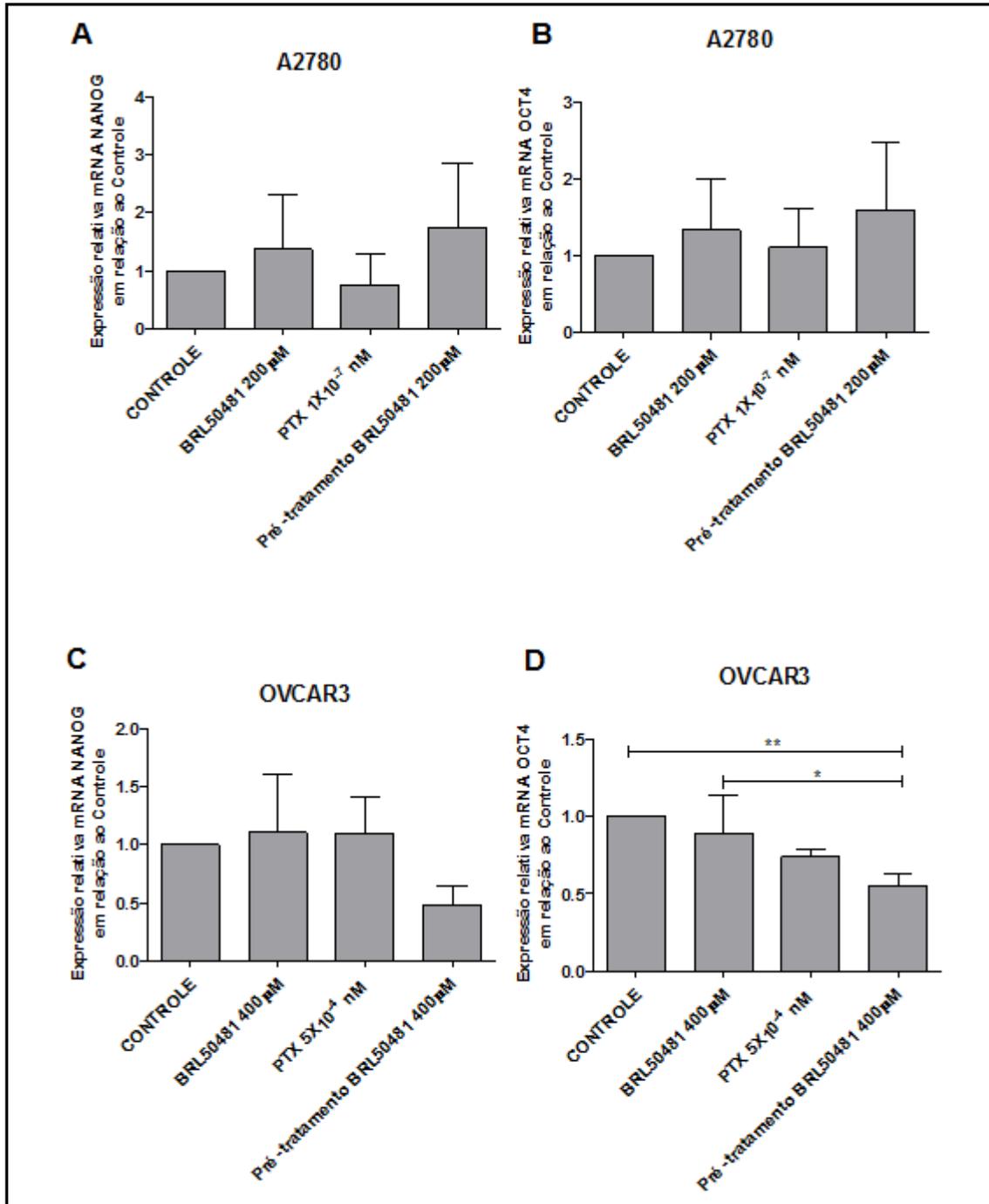


Figura 31: Análise da expressão dos marcadores de CTT NANOG e OCT4.

Células das linhagens A2780 (A) e (B) e OVCAR3 (C) e (D) foram tratadas com BRL50481 e PTX, em monoterapia, e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. Os experimentos foram realizados em duplicata mecânica. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. *p<0,5; **p<0,01.

5.12 AVALIAÇÃO DE VIAS CELULARES QUE PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE AÇÃO DE BRL50481

A fim de investigar as vias moleculares envolvidas na sobrevivência celular, células

de CAO V A2780 e OVCAR3 foram tratadas conforme descrito na TABELA 7 e, em seguida, o efeito da inibição na PDE7 foi avaliada em importantes vias relacionadas a proliferação, diferenciação e morte celular.

PTX é um modelador de diversas cascatas de sinalização celular, como as vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK. Este quimioterápico exerce seu efeito citotóxico por meio da ligação e estabilização dos microtúbulos e indução de apoptose em uma variedade de tipos celulares independente do status de p53 (DIAZ *et al.*, 2000; MOOS; FITZPATRICK, 1998). Além disso, AKT exerce um importante papel anti-apoptótico dependendo do estímulo. Ademais, estudos demonstraram que o aumento da expressão de AKT pode conferir resistência ao PTX (PAGE; LIN; JIN; CASTLE; *et al.*, 2000). Dessa forma, esta molécula se apresenta como um interessante alvo terapêutico (KIM *et al.*, 2007; SUNTERS *et al.*, 2006).

Dados da literatura mostram que em concentrações baixas (menor que nanomolar) os derivados de taxol se ligam em apenas a algumas frações dos microtúbulos, assim, o efeito principal do fármaco é inibir a despolimerização dos mesmos sem alterar a massa do polímero, enquanto que, em altas doses, o paclitaxel aumenta o número e a massa, aumentando a estabilidade dos microtúbulos e tornando-os não funcionais (DERRY *et al.*, 1997). Ainda, esses compostos produzem populações aneuplóides de células na ausência de um bloqueio mitótico sustentado (ORR *et al.*, 2003).

Conforme observa-se na FIGURA 32A, as células de A2780 tratadas com 200 μ M de BRL50481 por 6h apresentaram um aumento significativo na fosforilação de AKT comparado aos demais tratamentos. O mesmo não foi observado para os tempos de tratamento de 24 e 48h, indicando que o inibidor de PDE7 apresenta um efeito temporal na modulação da via PI3K/AKT/mTOR (FIGURA 32B). Interessante, quando as mesmas células foram tratadas com 1×10^{-7} nM PTX observou-se uma redução na fosforilação de AKT quando comparado ao controle ($p < 0,5$) (Figura 32B).

Além disso, o tratamento combinado de 200 μ M de BRL50481 e PTX na IC_{50} e o pré-tratamento das células com o inibidor de PDE7 proporcionaram a modulação negativa da via de PI3K/AKT/mTOR em relação ao tempo de tratamento de 6h com 200 μ M de BRL50481 em monoterapia (FIGURA 32B).

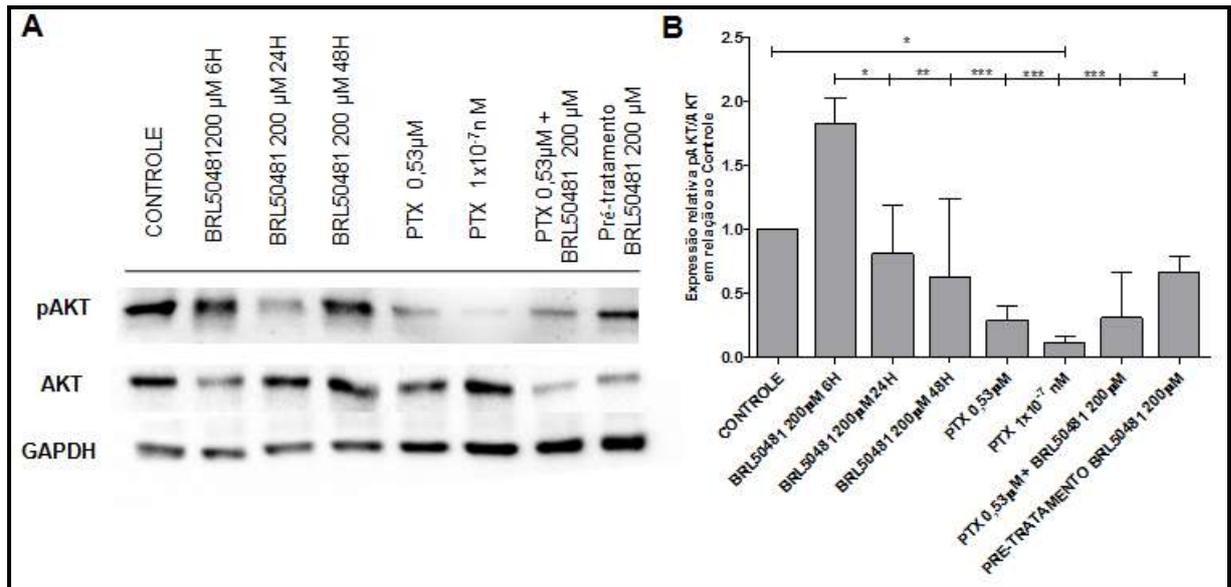


Figura 32: Análise da expressão de AKT total e AKT fosforilado na linhagem A2780. (A) As células foram tratadas com o inibidor BRL 50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados no gráfico. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. *p<0,5; **p<0,01; ***p<0,001.

Já na linhagem OVCAR3, observou-se uma diminuição na fosforilação de AKT em todas as condições de tratamento avaliadas em relação ao controle (FIGURA 33B). Dessa forma, a inibição de PDE7 modula negativamente a via de PI3K/AKT/mTOR e, conseqüentemente, os alvos da mesma.

Existe um amplo apelo para o desenvolvimento racional e estudos clínicos de inibidores da via PI3K/AKT/mTOR, especialmente para alguns subtipos de câncer os quais apresentam essa via geneticamente modificada e que podem ser beneficiados com o uso combinado de fármacos (GUIMARÃES *et al.*, 2015). A combinação desses inibidores com os quimioterápicos citotóxicos, bem como com outros agentes biológicos (compostos anti-HER2, inibidores de EGFR e agentes antiangiogênicos) podem otimizar os efeitos em diferentes vias que controlam a tradução de proteínas, o crescimento celular, a migração, a metástase e a angiogênese (GUIMARÃES *et al.*, 2015). A exemplo, estudos *in vivo* e *in vitro* conduzidos por HU *et al.* (2002) em CAOV demonstraram que a inibição de PI3K utilizando o composto LY294002 aumentou a apoptose induzida pelo paclitaxel.

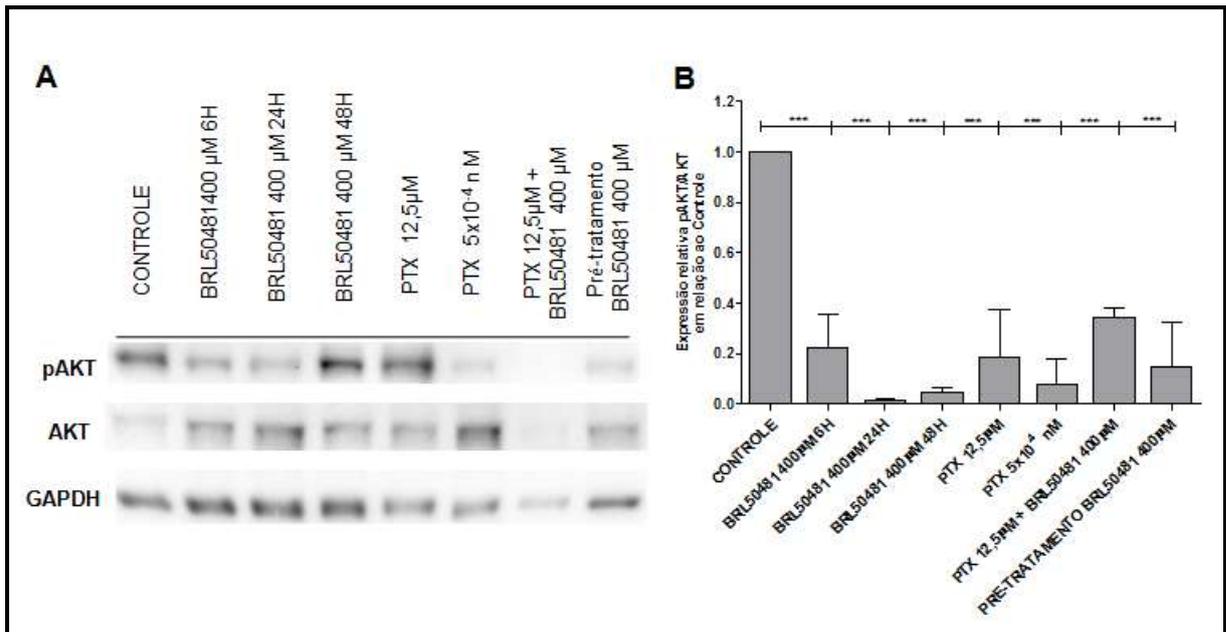


Figura 33: Análise da expressão de AKT total e AKT fosforilado na linhagem OVCAR3. (A) As células foram tratadas com o inibidor BRL 50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados em triplicata. Média e desvio padrão são mostrados no gráfico. Análise estatística: Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Ademais, nossos dados corroboram com o estudo realizado por TSUNODA et al. (2012), o qual a redução da atividade catalítica de PDE4 com o inibidor rolipram promoveu a diminuição da fosforilação de AKT em câncer de colorretal. SMITH et al (2005) também demonstraram diminuição na fosforilação de AKT em linhagens de linfoma de células B (DLBCLs), as quais apresentavam alta expressão PDE4-B, quando tratadas com o referido inibidor.

A capacidade de uma célula tumoral em responder a um agente quimioterápico é devido, em parte, à sua capacidade apoptótica (LING *et al.*, 2005). Além disso, o processo de apoptose induzido por fármacos é orientado pela regulação positiva de moléculas pró-apoptóticas e supressores tumorais, bem como pela modulação de fatores de sobrevivência celular. Assim, diversos genes estão envolvidos na indução ou inibição da apoptose como a proteína p53, AKT e PI3K, que apresentam expressão atípica no CAO (FRASER *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2000).

Motivados em investigar se modulação da via de PI3K/AKT/mTOR pode estar relacionada com a apoptose no nosso modelo proposto, visto que a ativação dessa

via leva a fosforilação de um antagonista da morte celular Bcl-2 e, conseqüentemente, inibição da apoptose (HASSAN *et al.*, 2014); avaliamos a expressão de um importante membro da família Bcl-2, a proteína pró-apoptótica Bax.

As proteínas membros da família Bax são ativadas por clivagem pelas caspases, inibição de proteínas cinases e/ou ativação de proteínas fosfatases e pelo aumento do pH intracelular (LI *et al.*, 1998). A proteína Bax está localizada no citoplasma e, após algum estímulo, migra para as mitocôndrias (WOLTER *et al.*, 1997) onde é capaz de liberar o citocromo C (JURGENSMEIER *et al.*, 1998), ativando a dimerização do fator de ativação de protease apoptótica 1 (APAF-1) e, por conseguinte, a cascata de apoptose. Ainda existe uma hipótese que Bax e Bcl-2 funcionam independentemente regulando a apoptose. Ambos são capazes de formar canais iônicos em membranas artificiais (SCHLESINGER *et al.*, 1997).

Embora a função de Bax possa ser inibida por Bcl-2, não é necessária uma interação para essa funcionalidade (PAWLOWSKI, 2000). Além disso, a remoção dos domínios BH1, BH2 e BH3 não impediu que a proteína Bax aumentasse a apoptose induzida pela quimioterapia (ZHA; REED, 1997) e a dimerização forçada de Bax com a proteína de ligação à FK506 (FKBP) induziu a translocação de Bax para as mitocôndrias e a morte celular mesmo na presença de Bcl-2 (GROSS *et al.*, 1998).

No nosso estudo, o pré-tratamento das células da linhagem A2780 com 200 μ M de BRL50481 seguido do tratamento com 200 μ M de BRL50481 e 1×10^{-7} nM de PTX promoveu um aumento em torno de 6 vezes da expressão da proteína Bax, comparado aos demais tratamentos. Ainda, após 24h de tratamento com 200 μ M de BRL50481 em monoterapia, observou-se uma tendência no aumento da expressão da proteína pró-apoptótica em relação aos demais tratamentos (FIGURA 34B).

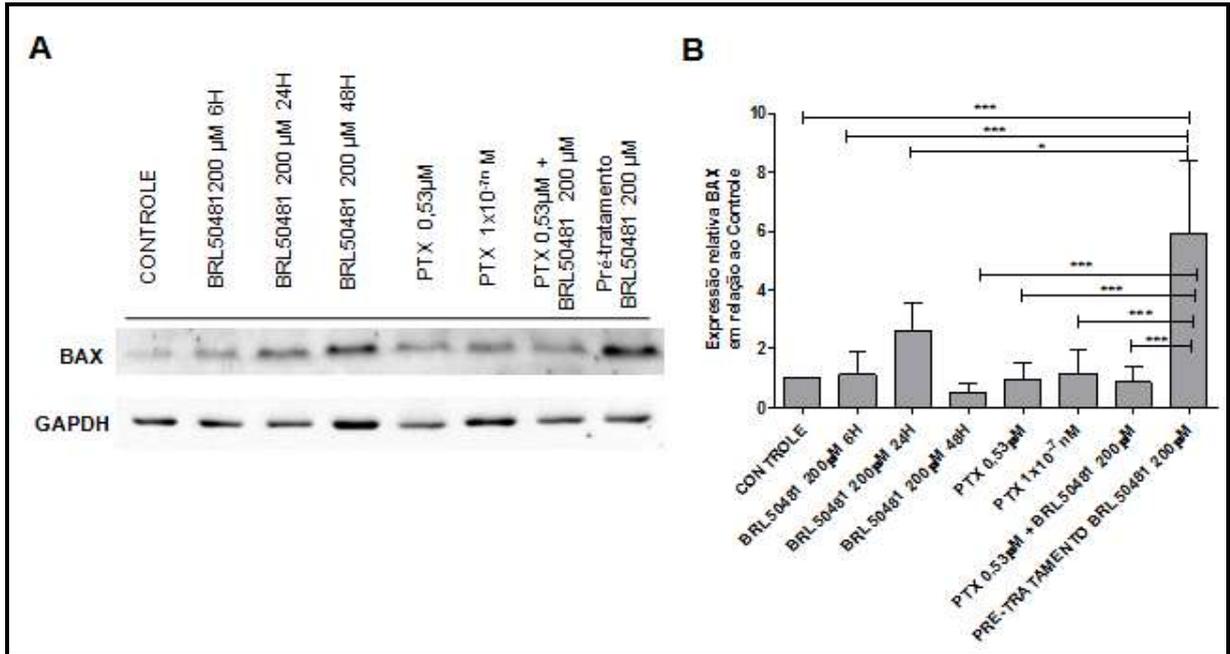


Figura 34: Análise da expressão da proteína pró-apoptótica BAX na linhagem A2780.

(A) As células foram tratadas com o inibidor BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481, seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a análise da densitometria de bandas amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados no gráfico. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$.

No entanto, na linhagem OVCAR3, observou-se que o tratamento em monoterapia com 400 μ M de BRL50481 não promoveu modulação da expressão de Bax nos tempos de tratamento analisados em relação ao controle. Além disso, ao analisarmos os efeitos de PTX em monoterapia e em associação com 400 μ M de BRL50481 é possível observar uma diminuição discreta da expressão de Bax (FIGURA 35B). Para melhor elucidação do resultado, será necessário realizar mais uma réplica biológica do experimento.

Nossos achados corroboram dados da literatura que mostram que o uso dos inibidores de PDE5 e 6, sildenafil e vardenafil, também induzem apoptose dependente de caspase em células B de leucemia linfocítica crônica (SARFATI *et al.*, 2003). Além disso, MOON *et al.* (2002) mostraram que a inibição da enzima PDE3-B aumentou a apoptose induzida pelo inibidor da PDE4 em um subconjunto de pacientes com leucemia linfocítica crônica.

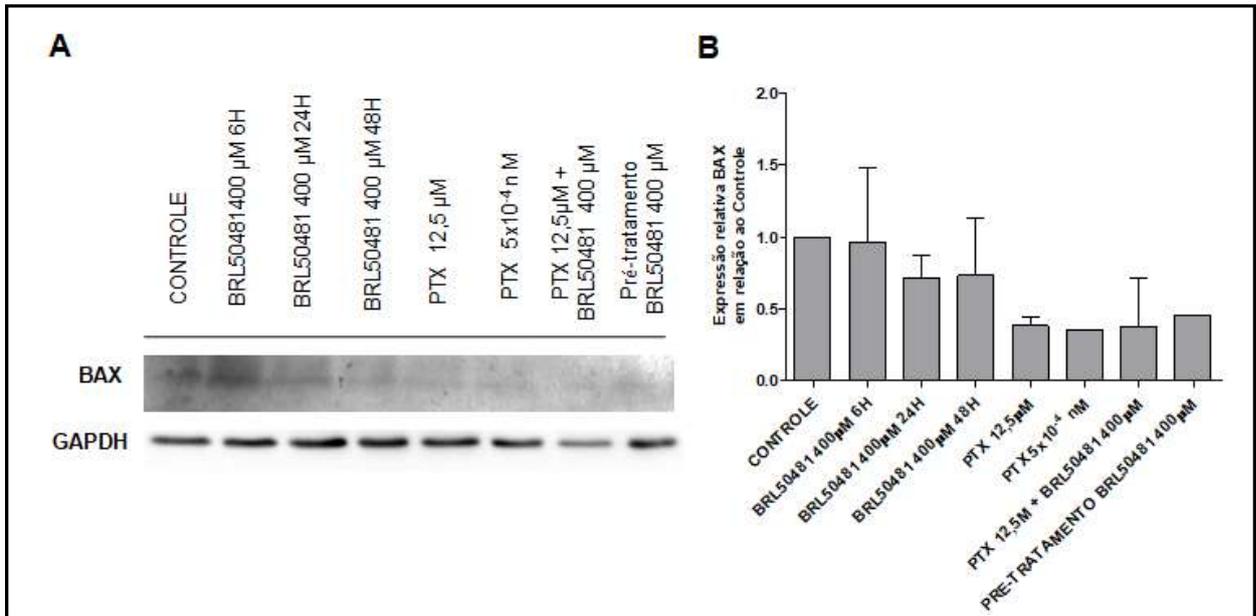


Figura 35: Análise da expressão da proteína pró-apoptótica BAX na linhagem OVCAR3.

(A) As células foram tratadas com o inibidor BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando duas réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados no gráfico.

Ademais, conforme discutido anteriormente na linhagem A2780, o tratamento combinado de PTX e BRL50481 favoreceu a diminuição da fosforilação de AKT e, conseqüentemente, a modulação de diversas vias celulares jusantes, dentre elas, a apoptose. Nosso dado é corroborado com os estudos conduzido SMITH et al. (2005) em células da linhagem DLBCLs o qual o inibidor rolipram também induziu a apoptose mediada por cAMP. A indução de apoptose nesta linhagem foi associada à diminuição da fosforilação de AKT e, conseqüentemente, à inibição da via PI3K/AKT/mTOR. Também foi observado atenuação da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL por meio do silenciamento de AKT em células epiteliais dos brônquios humanos transformadas com baixas doses de cloridrato de níquel (JING-JU *et al.*, 2011).

Dessa forma, a indução de apoptose na linhagem A2780 pode ser explicada, ao menos parcialmente, devido a diminuição da fosforilação de AKT e, conseqüente aumento da expressão de um modulador da via de apoptose quando as células foram tratadas pré-tratadas com o inibidor de PDE7 seguido do tratamento combinado de PTX e BRL50481. Ainda, esse resultado reforça a importância da cronologia do regime quimioterapêutico empregado no tratamento do CAOv.

Outro aspecto abordado na elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito da inibição da enzima PDE7 no CAO V foi a autofagia. Esta apresenta dupla função no câncer, atuando como um supressor tumoral impedindo a acumulação de proteínas danificadas e organelas, bem como pode atuar promovendo o crescimento celular.

Entender o papel da autofagia no tratamento do câncer é crítico, visto que muitas terapias têm mostrado ativar este mecanismo e pode ser um importante estratégia para prevenção do câncer (YANG *et al.*, 2011). Um dos possíveis mecanismos de ação envolvido é a promoção de uma catástrofe metabólica pela depleção mitocondrial e dos substratos metabólicos. Estudos em *Drosophila* mostraram que a alta expressão de *Atg1* é suficiente para induzir autofagia e levar a morte celular via dependente ou independente de caspase dependendo do tipo celular (BERRY; BAEHRECKE, 2007; CHANG *et al.*, 2013)

A proteína Beclina-1 é necessária para a indução da autofagia e camundongos com o fenótipo Beclina-1^{-/-} mostraram ser mais propensos aos tumores, indicando que esse é um gene supressor de tumor haploinsuficiente (QU *et al.*, 2003). Em contrapartida, a estimulação excessiva da autofagia devido à superexpressão de Beclina-1 pode inibir o desenvolvimento tumoral (LIANG *et al.*, 1999). Esta proteína pode interagir tanto com Bcl-2 quanto com a proteína PI3K classe III e desempenha um papel crítico na regulação da autofagia e morte celular (VALENTE *et al.*, 2014).

Ademais, estudo conduzido por ELGENDY *et al.* (2011) em células epiteliais da superfície do ovário humano, a expressão do oncogene H-Ras^{V12} leva à morte celular independente de caspase com características de autofagia. Esta morte celular dependente de autofagia induzida por Ras foi associada com a regulação positiva da proteína Noxa contendo apenas o domínio BH3 e do regulador de autofagia, a proteína Beclina-1.

Nossos resultados mostraram que na linhagem A2780, observou-se um aumento significativo da expressão da proteína Beclina-1 após 6h de tratamento com 200 µM do inibidor BRL50481 quando comparado aos demais tratamentos avaliados. O mesmo não foi verificado nos tempos de tratamento 24 e 48h, o que indica que o efeito é tempo-dependente (FIGURA 36B). Também é possível observar um aumento, mesmo que discreto, na expressão de Beclina-1 para os tratamentos com 1x10⁻⁷ nM de PTX e as terapias de associação de BRL50481 e PTX em relação ao

controle (FIGURA 36B).

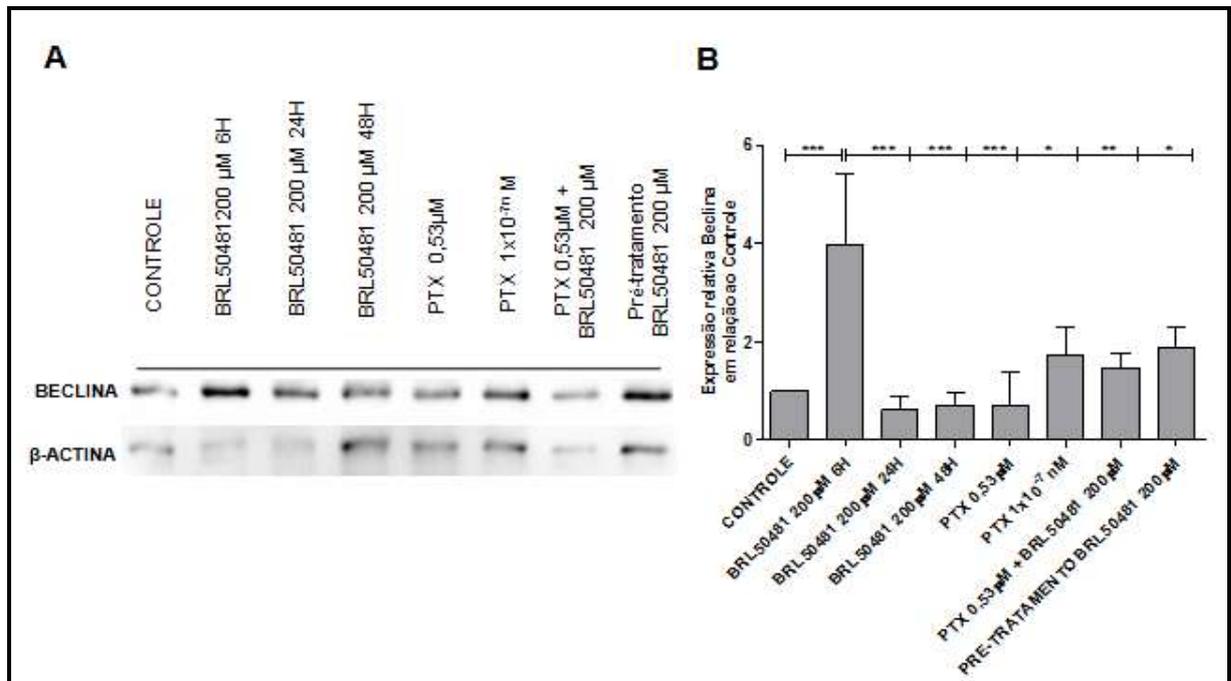


Figura 36: Análise da expressão de Beclina-1 na linhagem A2780.

(A) As células foram tratadas com o inibidor BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado a β -actina. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados no gráfico. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$.

Já para a linhagem OVCAR3, o tratamento com 400 μ M de BRL50481 em 6h mostrou uma tendência em modular positivamente a expressão de Beclina-1 quando comparado ao controle. Ainda é possível observar uma tendência na regulação positiva da expressão da proteína quando as células da referida linhagem foram tratadas com PTX na IC_{50} , bem como no pré-tratamento com BRL50481 seguido da associação de BRL50481 e PTX (FIGURA 37).

Outros estudos já haviam reportado a importância da autofagia na progressão tumoral. PAL et al. (2015) avaliaram o efeito de um novo inibidor de AKT, BI-69A1, em câncer de cólon e observaram que o mesmo induziu autofagia inicial por meio da inibição da via AKT/mTOR/p70S6 cinase. Os autores observaram ainda um aumento na acumulação de LC3-GFP no citoplasma, a conversão de LC3-I to LC3-II e o aumento de outros marcadores autofágicos como Beclina-1. Além disso, LIN et al. (2013) verificaram que pacientes com carcinoma ovariano que apresentaram

diminuição na expressão de Beclina-1 e aumento na expressão de Bcl-xL apresentaram um pior prognóstico. Os autores sugeriram ainda Beclina-1 como ferramenta adicional na identificação de pacientes com risco de progressão tumoral.

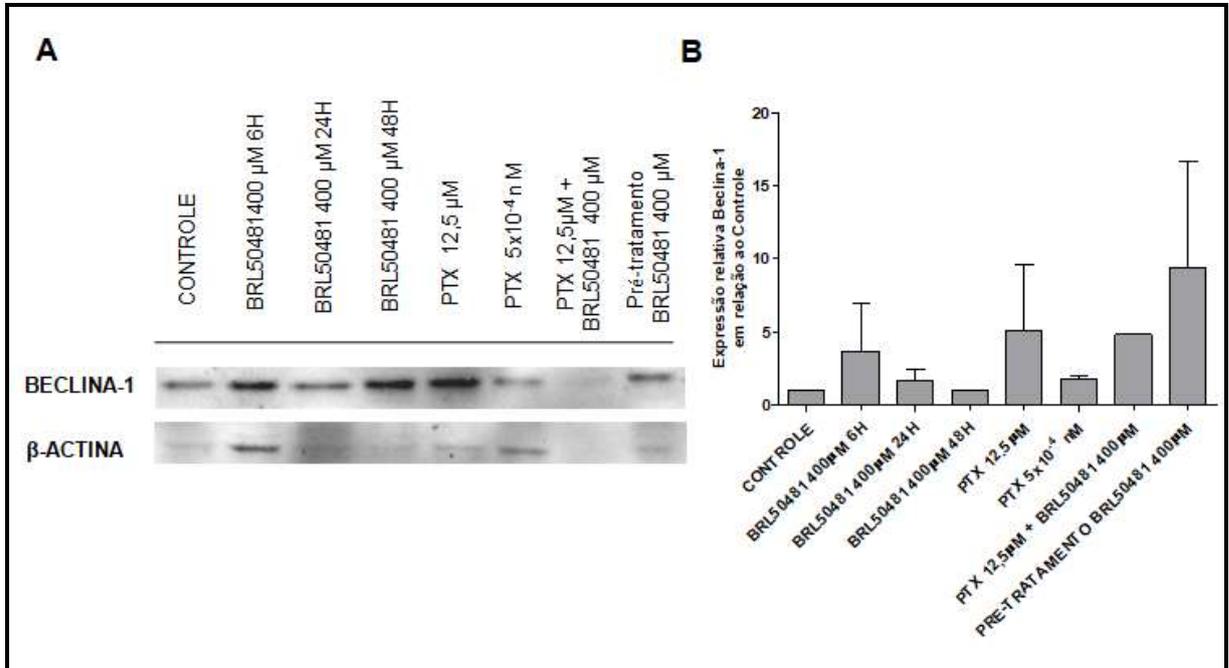


Figura 37: Análise da expressão de Beclina-1 na linhagem OVCAR3.

(A) As células foram tratadas com o inibidor BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a análise de densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado β -actina. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados no gráfico.

É importante salientar ainda que LADDHA et al. (2014) associaram a maioria das mutações em Beclina-1 com mutações no gene supressor de tumoral *BRCA1*. Esses achados suportam o papel distinto que a autofagia pode desempenhar no câncer tanto como um inibidor inicial da oncogênese como um facilitador da progressão tumoral. Dessa forma, o contexto celular influencia na forma como a autofagia impacta no desenvolvimento tumoral. Estes estudos têm grandes implicações para o uso de moduladores de autofagia na terapia de câncer.

Ainda, um dado nos chamou atenção. No tempo de tratamento de 6h, as células da linhagem A2780 apresentaram, concomitantemente, ativação da via PI3K/AKT/mTOR e aumento da expressão da proteína Beclina-1. No entanto, estudos mostram que a autofagia é negativamente regulada por mTORC1, proteína central que integra diversas vias celulares (MEIJERA; CODOGNO, 2004). Esse dado

precisa ser investigado e a expressão da proteína Bcl-2 avaliada.

Dessa forma, pode-se inferir que os mecanismo envolvidos nas terapias de associação de BRL50481 e PTX perpassam pela via de PI3K/AKT/mTOR e de apoptose e pela modulação parcial da via de autofagia.

Outra importante via de sinalização celular modulada nos diversos tipos de câncer é a via de MAPK/ERK. Os sinais transmitidos por essa cascata de sinalização pode induzir a ativação de diversas moléculas que regulam a sobrevivência celular e a diferenciação (MANSOUR *et al.*, 1994; SMALLEY, 2003).

O tratamento das células da linhagem A2780 com 200 μ M de BRL50481, em monoterapia, promoveu aumento da fosforilação de ERK, comparado às células pré-tratadas somente com o inibidor ($p < 0,5$) no tempo de tratamento de 48h. Ainda, o tratamento combinado de PTX na IC_{50} e 200 μ M de BRL50481 também ativou a via MAPK/ERK, comparado ao controle, ao tratamento com 200 μ M de BRL50481 no tempo de tratamento de 6h, PTX na concentração de 1×10^{-7} nM e ao pré-tratamento, o que reforça que a cronologia do tratamento influencia na modulação das vias de sinalização (FIGURA 38B).

Na linhagem A2780, a politerapia pode ter desencadeado o aumento da fosforilação de ERK como um possível mecanismo de resistência à estratégia antitumoral proposta, visto que vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK estão ativadas em uma grande variedade de câncer. Devido a ativação cruzada das vias e a convergência das mesmas, a inibição de uma via específica pode levar a ativação da outra via, diminuindo, assim, a eficácia dos quimioterápicos (TURKE *et al.*, 2012).

Esse mecanismo pode explicar, ao menos parcialmente, o efeito da politerapia no aumento da fosforilação de ERK com concomitante inibição da fosforilação de AKT. Desse modo, a inibição de ambas as vias torna-se uma estratégia eficaz na diminuição da indução da resistência e, por conseguinte, na sobrevivência celular.

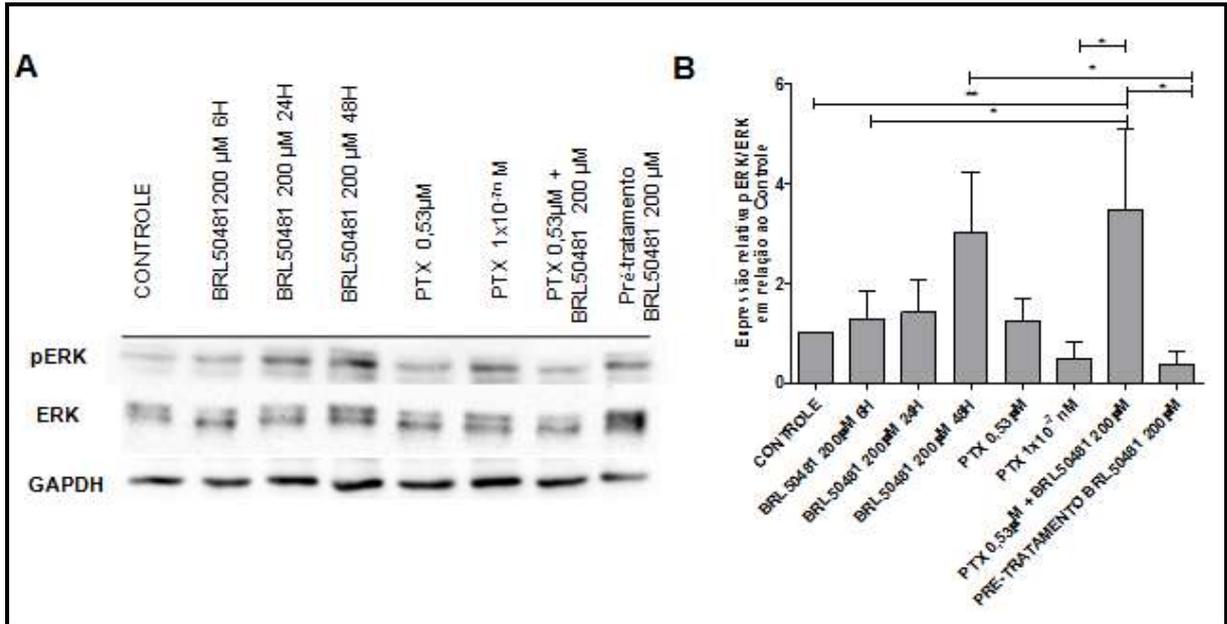


Figura 38: Análise da expressão de ERK total e ERK fosforilado na linhagem A2780.

(A) As células foram tratadas com o inibidor 200 µM de BRL 50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a análise de densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na linhagem OVCAR3, a via de MAPK/ERK não constitui um mecanismo de resistência à politerapia combinada de PTX e BRL50481, o que torna a estratégia empregada promissora no tratamento do CAOV (FIGURA 39).

Ademais, segundo WANG et al. (2012) as vias MAPK/ERK e PI3K/AKT podem ser moduladas pela citocina IL-6. Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX promoveu o aumento da expressão gênica e da secreção de IL-6 na linhagem OVCAR3 (FIGURAS 27A e 29). No entanto, a mesma não foi capaz de modular a expressão de AKT e ERK (FIGURAS 33 e 39).

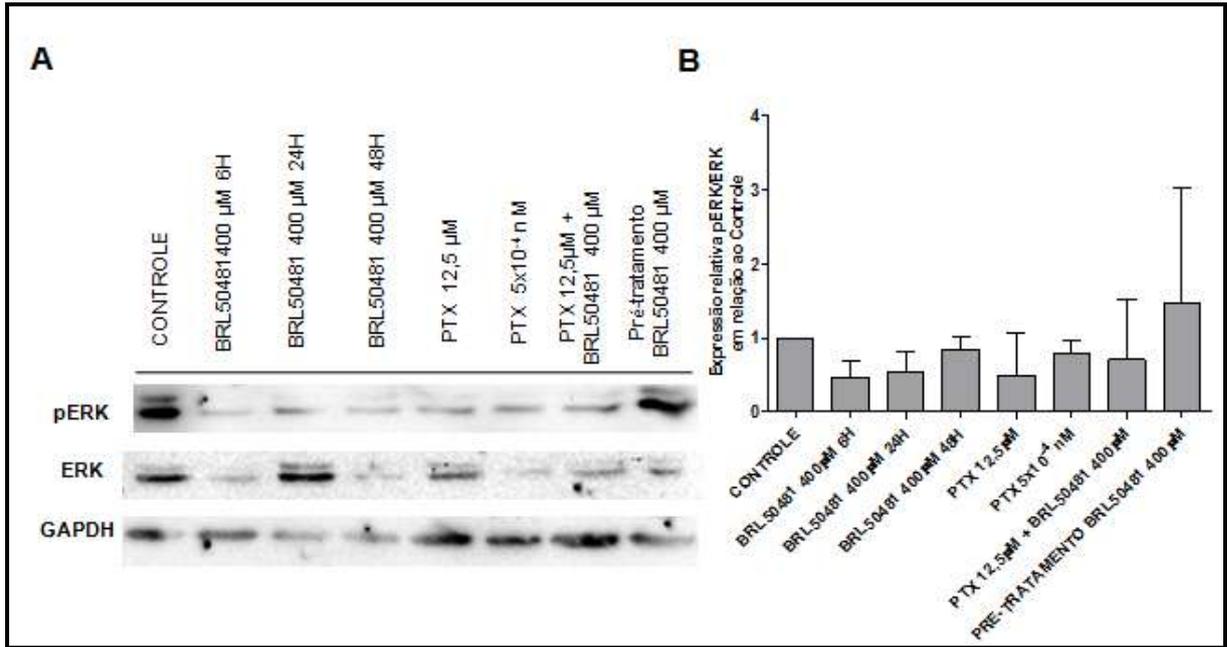


Figura 39: Análise da expressão de ERK total e ERK fosforilado na linhagem OVCAR3.

(A) As células foram tratadas com o inibidor BRL 50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni.

Outra via investigada foi a da enzima glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β), uma serina/treonina cinase, que foi identificada pela primeira vez no metabolismo do glicogênio. Esta cinase multifuncional possui diversos substratos, incluindo fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular e de sobrevivência e proteínas oncogênicas e proto-oncogênicas (DOBLE; WOODGETT, 2003). Ao contrário da maioria das proteínas cinases, a GSK-3 β é constitutivamente ativa em células em repouso e sofre uma inibição rápida e transitória em resposta a sinais externos. A atividade da GSK-3 β é regulada por fosforilação. A atividade completa de GSK-3 β geralmente requer a fosforilação no resíduo 216, e inversamente, a fosforilação no resíduo de serina 9 inibe a atividade da enzima (CAI *et al.*, 2007; JOPE; JOHNSON, 2004).

Um estudo conduzido por CAO *et al.* (2006) em carcinoma de ovário mostraram um novo papel para a GSK-3 β na regulação da proliferação das células por meio do controle da progressão do ciclo celular e da expressão de ciclina D1.

Os dados mostraram uma tendência ao aumento da expressão da proteína GSK-3 β ^{SER9} fosforilada promovido pelo tratamento combinado de PTX na IC₅₀ e 200 μ M de BRL50481 em relação ao controle, nas células da linhagem A2780. Para melhor elucidação do resultado, será necessário realizar mais uma réplica biológica do experimento (FIGURA 40).

Já na linhagem OVCAR3, observou-se uma tendência na diminuição da fosforilação da proteína GSK-3 β no resíduo de serina 9 em todos os tratamentos em relação ao controle (FIGURA 40). O resultado é referente a apenas um experimento (N=1). Para melhor compreender o efeito da inibição de PDE7 no carcinoma de ovário seroso alto grau será necessário a realização de outras réplicas biológicas.

Interessantemente, um estudo conduzido por MORALES-GARCIA et al. (2014) demonstraram que os inibidores de PDE7 podem também ser considerados como potentes inibidores indiretos de GSK-3 por meio da via de sinalização de cAMP/PKA e da fosforilação de GSK-3 no resíduo de Serina 9 e, subsequente, inativação da mesma. Esses inibidores apresentaram um duplo mecanismo de ação e um potencial terapêutico para a regulação de processos de neuroinflamação em diferentes lesões cerebrais. Além disso, outros autores já haviam observado a eficácia *in vivo* de inibidores PDE7 quimicamente diversos em diferentes modelos murinos de doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer (PEREZ-GONZALEZ et al., 2013), doença de Parkinson (MORALES-GARCIA et al., 2011) e esclerose múltipla (GONZALEZ-GARCIA et al., 2013).

Na linhagem A2780, um dos possíveis mecanismos de ação proposto consiste no efeito indireto na inibição da atividade de GSK-3 β promovido pelo inibidor de PDE7. Este pode apresentar efeito dual tanto por meio da ativação de PKA por mecanismos dependentes ou independentes de cAMP ou indiretamente pela fosforilação de GSK-3 β no resíduo de serina 9. Assim, a diminuição da proliferação celular pode perpassar pela modulação dessa via. Para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos será necessário avaliar a atividade de PKA.

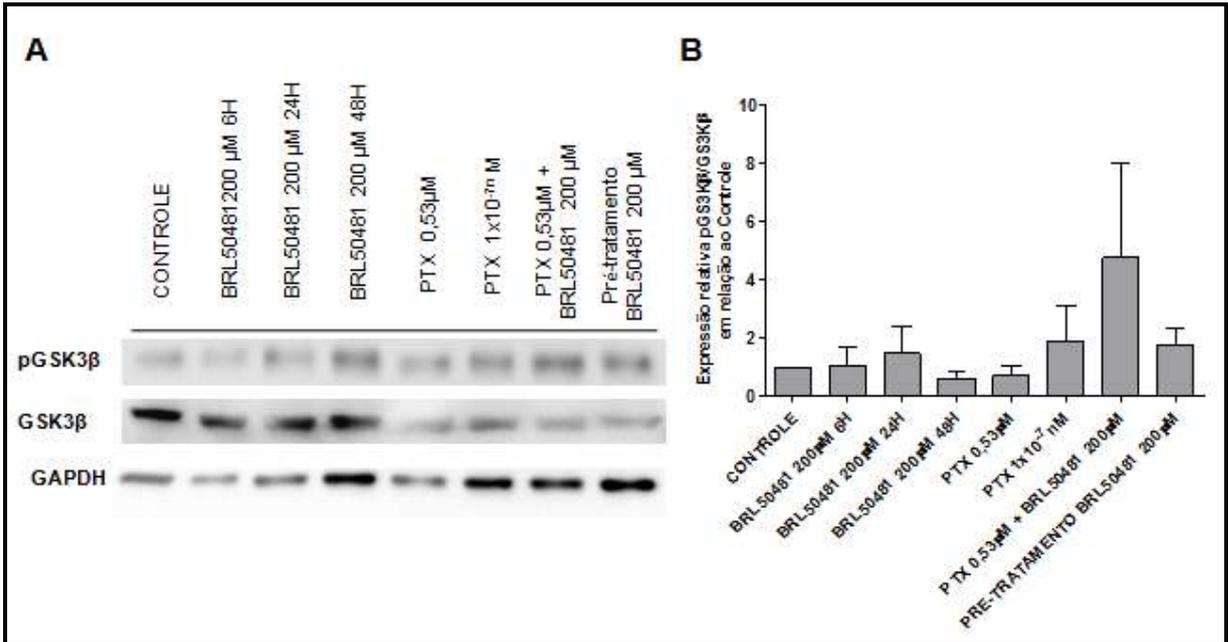


Figura 40: Análise da expressão de GSK β total e GSK β fosforilado na linhagem A2780. (A) As células foram tratadas com o inibidor de BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando duas réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

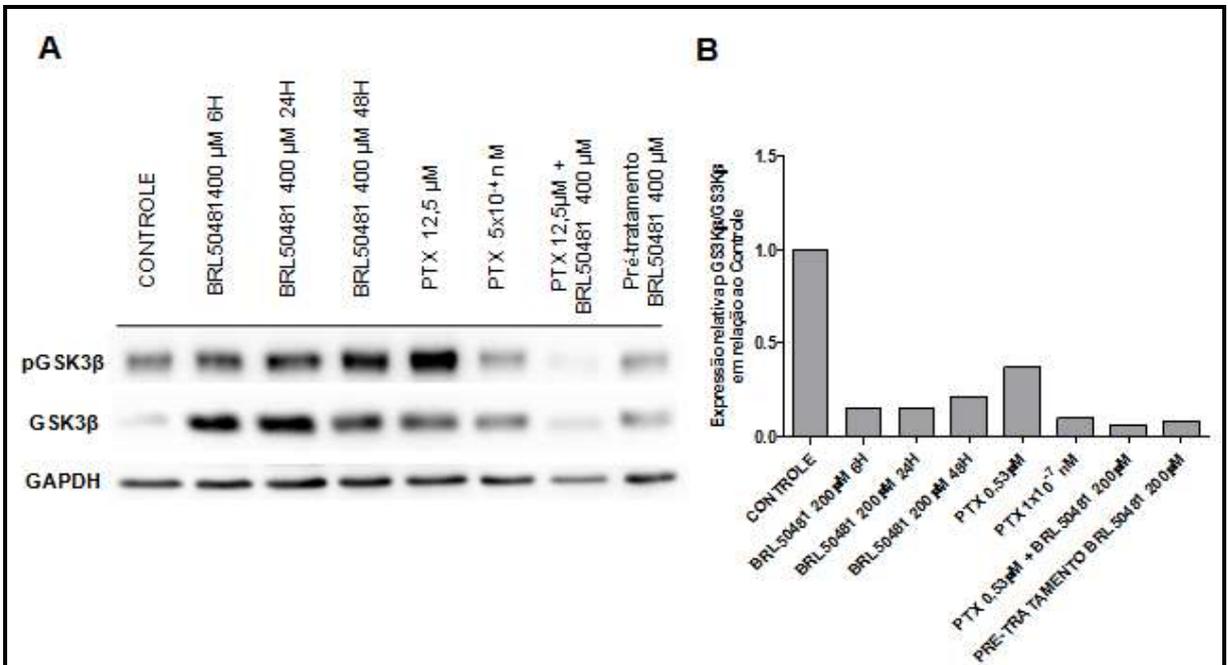


Figura 41: Análise da expressão de GSK β total e GSK β fosforilado na linhagem OVCAR3. (A) As células foram tratadas com o inibidor de BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. Foi realizado apenas uma réplica biológica.

Assim, as principais vias de sinalização que podem ser moduladas pela inibição da enzima PDE7 no carcinoma ovariano estão resumidas na FIGURA 42.

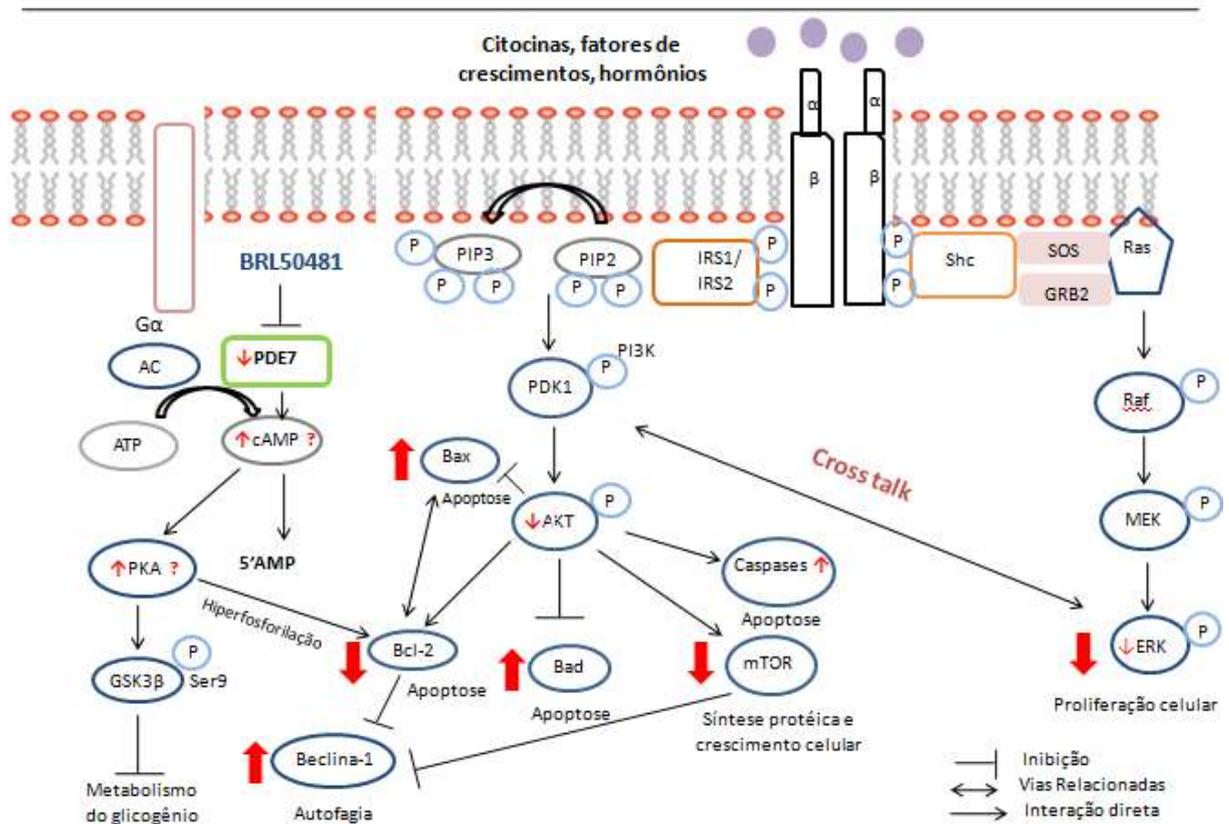


Figura 42: Esquema mostrando as principais vias de sinalização moduladas pela enzima PDE7. Legenda: ponto de interrogação referente às moléculas as quais os níveis/atividade não foram avaliados.

5.13 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DAS VIAS DE PKA, PKC E PI3K/AKT/MTOR NA EXPRESSÃO DE CLDN-16

As JO são compostas por três principais proteínas integrais de membrana: ocludinas, claudinas e as moléculas de adesão. Embora os papéis exatos dessas proteínas não estejam completamente elucidados, as CLDNs formam a espinha dorsal dessa estrutura (MORIN, 2005). Além disso, as células tumorais frequentemente exibem JO com função anormal, bem como a diminuição da diferenciação e da polaridade celular. A perda da integridade da JO pode ser particularmente importante na permissão da difusão dos nutrientes e de outros fatores necessários para sobrevivência e crescimento tumoral (SOLER *et al.*, 1996; WEINSTEIN *et al.* 1976).

Diversos estudos mostram que a atividade das proteínas cinases PKA e PKC são importantes na regulação e localização da expressão das proteínas CLDNs por diversos mecanismos como a fosforilação (D'SOUZA *et al.* 2005).

Proteínas da família PKC são envolvidas em uma variedades de processos celulares relacionados a promoção tumoral e progressão, incluindo a adesão (BRENNER *et al.*, 2010; KILEY *et al.*, 1999), a sobrevivência celular (HSIEH *et al.*, 2007), a invasão (MANDIL *et al.*, 2001) e a formação de metástase (NAKASHIMA, 2002). A exemplo, o tratamento de células de melanoma com PMA, ativador das isoformas convencionais de PKC, aumentou a expressão (KOIZUMI *et al.*, 2008) e a distribuição citoplasmática da CLDN-1 e reduziu simultaneamente a integridade da barreira da JO (LIPPOLDT *et al.*, 2000). Os autores também mostraram que a translocação dessa proteína do núcleo para o citoplasma ocorre por meio da ativação de PKA (FRENCH *et al.*, 2009).

Em oposição ao que foi encontrado em melanoma (LIPPOLDT *et al.*, 2000) e no carcinoma de fígado, no qual a ativação da via de sinalização c-Abl-PKC é crítica para expressão e ativação de MMP-2 e, conseqüentemente, indução da invasão celular em resposta à expressão de CLDN-1 (YOON *et al.*, 2010); no nosso trabalho, as células da linhagem A2780 tratadas com PMA apresentaram uma tendência à diminuição da expressão de CLDN-16 quando comparado ao controle, após 24h de tratamento. O mesmo efeito não foi observado no tempo de tratamento de 6h. Interessantemente, quando as células foram tratadas com Calphostin C, um potente inibidor de PKC, ambos os tempos de tratamento apresentaram uma tendência à diminuição da expressão da mesma (FIGURA 43).

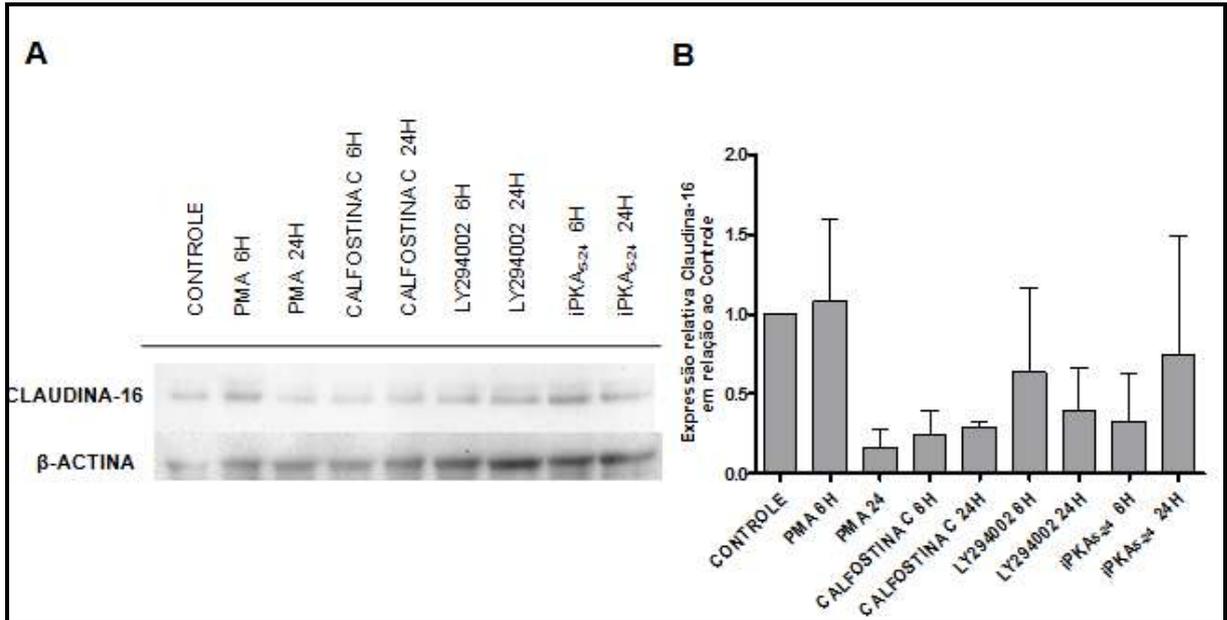


Figura 43: Análise da expressão de claudina-16 na linhagem A2780.

(A) As células foram tratadas com ativadores e inibidores das vias PKC, PI3K e PKA em diferentes tempos. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado a β -actina. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni.

Diversos trabalhos já haviam reportado o aumento significativo na expressão de CLDN-16 em CAOV quando comparado aos tecidos normais (KUO, *et al.*, 2010; RANGEL, *et al.*, 2003). Além disso, a superexpressão de CLDN-16 foi correlacionado com alterações na polaridade celular em carcinomas papilares indiferenciados da tireóide (FLUGE *et al.*, 2006). Dessa forma, a partir dos nossos dados na linhagem de CAOV A2780 pode-se inferir que PKC atua modulando negativamente a expressão de CLDN-16 o que pode contribuir direta ou indiretamente na polaridade celular e/ou localização da mesma na célula. Conforme pode ser observado tanto o uso de ativador quanto de inibidor de PKC promoveram modulação negativa na expressão de CLDN-16. Esse resultado deve ser melhor investigado avaliando outros inibidores de PKC, bem como outros tempos de tratamento, a fim de verificar o efeito curso temporal do inibidor.

Ademais, um estudo realizado por D'SOUZAA *et al.* (2007) em CAOV mostrou que a proteína CLDN-4 pode ser fosforilada nos resíduos Thr189 e Ser194 por PKC, resultando em uma ruptura da barreira celular na JO. Além disso, os autores demonstraram que após a ativação de PKC mediada por PMA, as células da

linhagem OVCAR433 apresentaram uma diminuição na resistência na JO e alteração na localização da CLDN-4. A modulação da atividade de CLDN-4 por PKC ϵ não somente forneceu um mecanismo de rompimento da função da JO no CAO, mas também pode ser importante na regulação da função normal da JO em células epiteliais.

Nesse contexto, as células da linhagem A2780 foram tratadas com o inibidor da via de PI3K/AKT/mTOR denominado LY 294002. Conforme observou-se na FIGURA 43, a inibição da referida via apresenta uma tendência à modulação negativa da expressão de CLDN-16. É possível ainda inferir que a diminuição da expressão da proteína é tempo-dependente.

A modulação da expressão das proteínas CLDNs pela via PI3K/AKT/mTOR já vem sendo descrito na literatura. A exemplo, um estudo conduzido por HICHINO et al. (2017) em células de adenocarcinoma de pulmão que apresentava alta expressão de CLDN-2 mostrou que quando as mesmas foram tratadas com LY 294002 e AZA, inibidor de metilação do DNA, estas exibiram diminuição na expressão de CLDN-2 e redução da proliferação celular e, conseqüentemente, modulação da via PI3K/AKT/NF κ B. Outro estudo conduzido SONOKI et al. (2015) também em linhagem de carcinoma de pulmão A549, os autores observaram que a inibição das vias MAPK/ERK/cFos e PI3K/AKT diminuiu a expressão de CLDN-2. Assim, estes trabalhos corroboram com os dados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa.

Outra importante via investigada que pode modular a expressão das proteínas CLDNs foi a PKA. Esta via é conhecida por regular a montagem e a abertura da rota paracelular em células epiteliais e endoteliais. A atividade de PKA é estimulada pelo tratamento com cAMP permeável ou pela ação de drogas que ativam a enzima adenilato ciclase ou que inibem as enzimas fosfodiesterases e, em consequência, promovem o aumento do nível intracelular de cAMP (GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.* 2008).

Foi possível observar na FIGURA 43 que os tratamento das células da linhagem A2780 com o inibidor iPKA₅₋₂₄, inibidor amida da proteína cinase A dependente cAMP (5-24), promoveram uma tendência à diminuição da expressão de CLDN-16. Ademais, estudos conduzidos por IKARI et al. (2008) já haviam demonstrado que as proteínas CLDN-16 são reguladas pela fosforilação dependente da via cAMP/PKA

em células de Madin-Darb de rim canino, resultando na localização na JO e na manutenção da reabsorção de Mg^{2+} . Assim, no nosso estudo, o uso do inibidor de PKA promoveu diretamente a modulação negativa da expressão da proteína CLDN-16 o que pode contribuir para reorganização das JO.

Interessados em avaliar se a inibição de PDE7 poderia afetar a expressão de CLDN-16. As células da linhagem A2780 foram tratadas com o inibidor de PDE7 em monoterapia e em associação com PTX. Embora as diferenças encontradas não sejam significativas, pode-se observar na FIGURA 44B uma tendência dos tratamentos com o inibidor em monoterapia e o pré-tratamento com BRL50481 seguido da associação de BRL50481 e PTX em promover uma maior expressão de CLDN-16 em relação ao controle.

O mesmo fenômeno foi observado na linhagem OVCAR3. O tratamento das células com inibidor de PDE7 em monoterapia proporcionou um aumento na expressão de CLDN-16 nos tempos de 6 e 48h quando comparado aos demais tratamentos. Ainda, o pré-tratamento das células com BRL50481 proporcionou um aumento na expressão de CLDN-16 embora menos evidente que observado nos tratamentos em monoterapia (FIGURA 45). Não foi possível avaliar a expressão de CLDN-16 no tratamento de associação de BRL50481 e PTX, pois o referido tratamento interferiu com a expressão do normalizador β -actina. Para melhor elucidação do papel de CLDN-16 na linhagem OVCAR3 é necessário a realização de outras réplicas biológicas.

Assim, a inibição de PDE7 proporcionou um aumento na expressão de CLDN-16. O significado biológico da diminuição e/ou aumento da proteína CLDN-16 na formação, permeabilidade e transdução de sinal nas JOs deve ser melhor investigado por meio de ensaios de resistência transepitelial e imunofluorescência. Além disso, o silenciamento de CLDN-16 pode auxiliar na melhor entendimento do papel desempenhado por essa proteína na progressão tumoral.

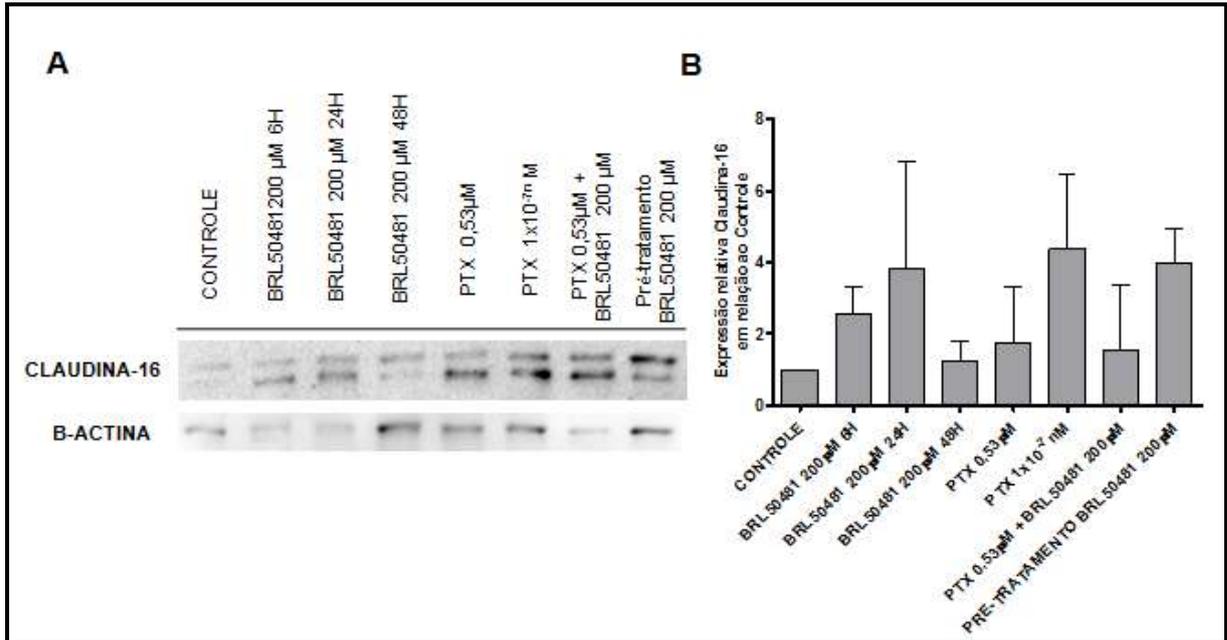


Figura 44: Análise da expressão de claudina-16 na linhagem A2780 após tratamento com inibidor de PDE7.

(A) As células foram tratadas com o inibidor de BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado a β -actina. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas. Média e desvio padrão são mostrados nos gráficos. Análise estatística: Teste ANOVA de duas vias com post test de Bonferroni.

5.14 A INIBIÇÃO DE PDE7 NÃO AFETOU A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS NAS LINHAGENS DE CAO V A2780 E OVCAR3

A migração celular é um processo de múltiplos passos altamente integrado iniciado pela protusão da membrana celular (BAILLY; CONDEELIS, 2002). A formação desta estrutura é conduzida pela regulação espacial e temporal da polimerização de actina nas células que estão na linha de frente (POLLARD; BORISY, 2003).

Em ambas as linhagens analisadas, a inibição de PDE7 com o agente BRL50481 não afetou a migração das células em comparação com o controle, o que mostra que o inibidor em monoterapia não é capaz de impedir a migração celular nas condições analisadas (FIGURAS 46 e 47).

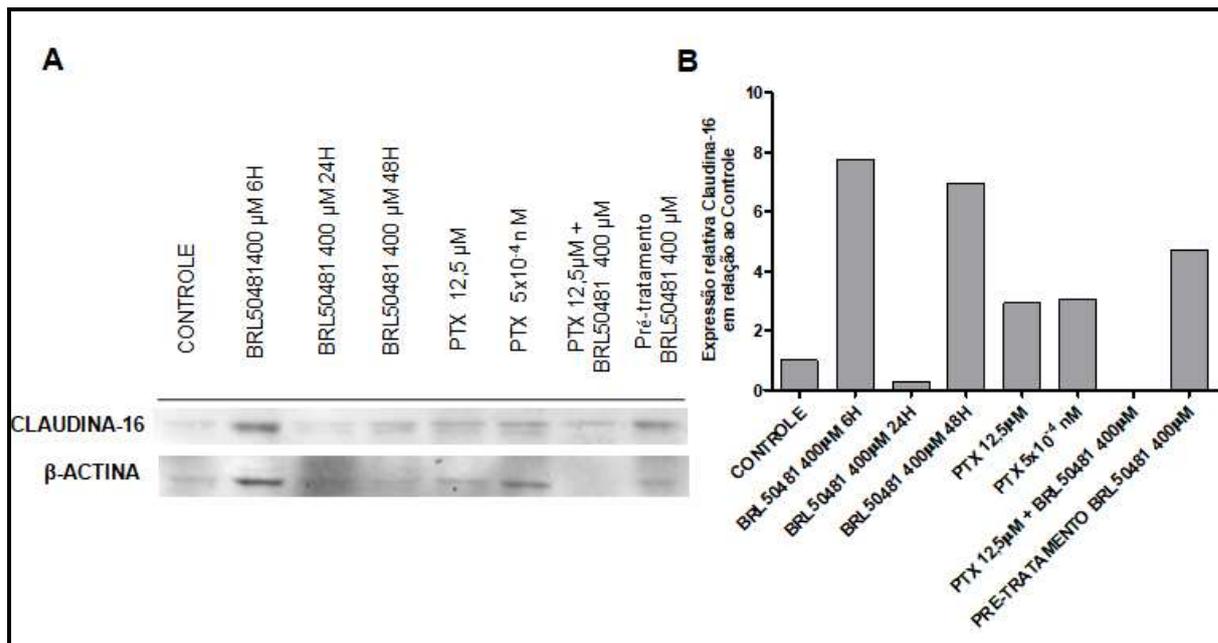


Figura 45: Análise da expressão de claudina-16 na linhagem OVCAR3 após tratamento com inibidor de PDE7.

(A) As células foram tratadas com o inibidor de BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. (B) Para a densitometria de bandas das amostras foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado a β -actina. Foi realizado apenas uma réplica biológica (N=1).

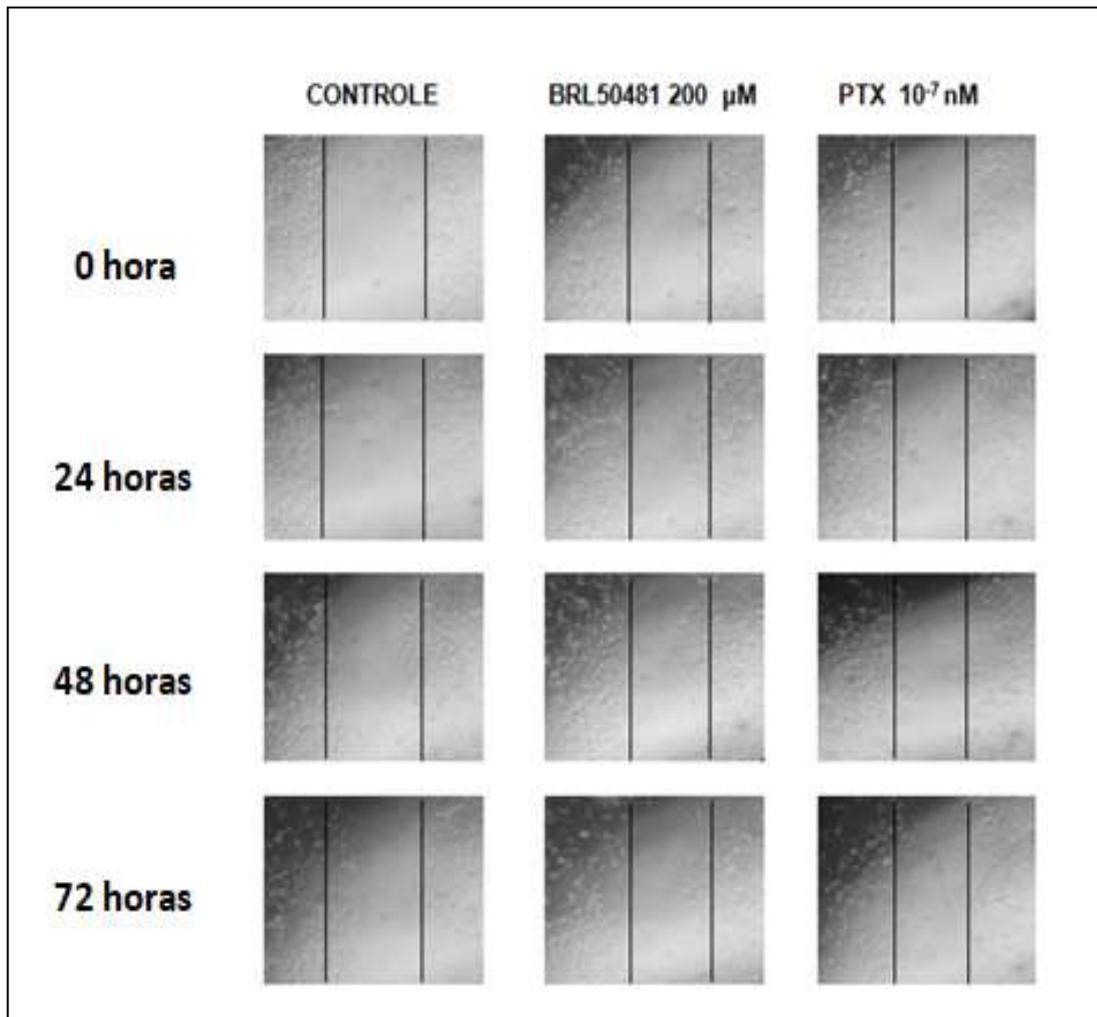


Figura 46: Ensaio de migração celular na linhagem A2780.

Células da linhagem A2780 foram semeadas na densidade $0,4 \times 10^6$ cel/mL e após 24 h de aderência, incubadas com Mitomicina C por 2 h. Posteriormente, foi realizado o arranhão na monocamada celular e as células tratadas com BRL50481 e PTX, em monoterapia. O experimento foi acompanhado por 72h. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas.

Na linhagem A2780, o tratamento com PTX na concentração 1×10^{-7} nM também não inibiu a migração. Assim, o emprego de BRL50481 e PTX, em monoterapia, não afetou a migração nos tempos analisados. No entanto, após 72h de incubação, pode-se observar uma maior morte celular em todas as condições analisadas, indicando que as células já estavam em sofrimento. Ainda, analisando somente o controle, observa-se que as células da linhagem A2780 apresentam um taxa de migração, em geral, baixa (FIGURA 46).

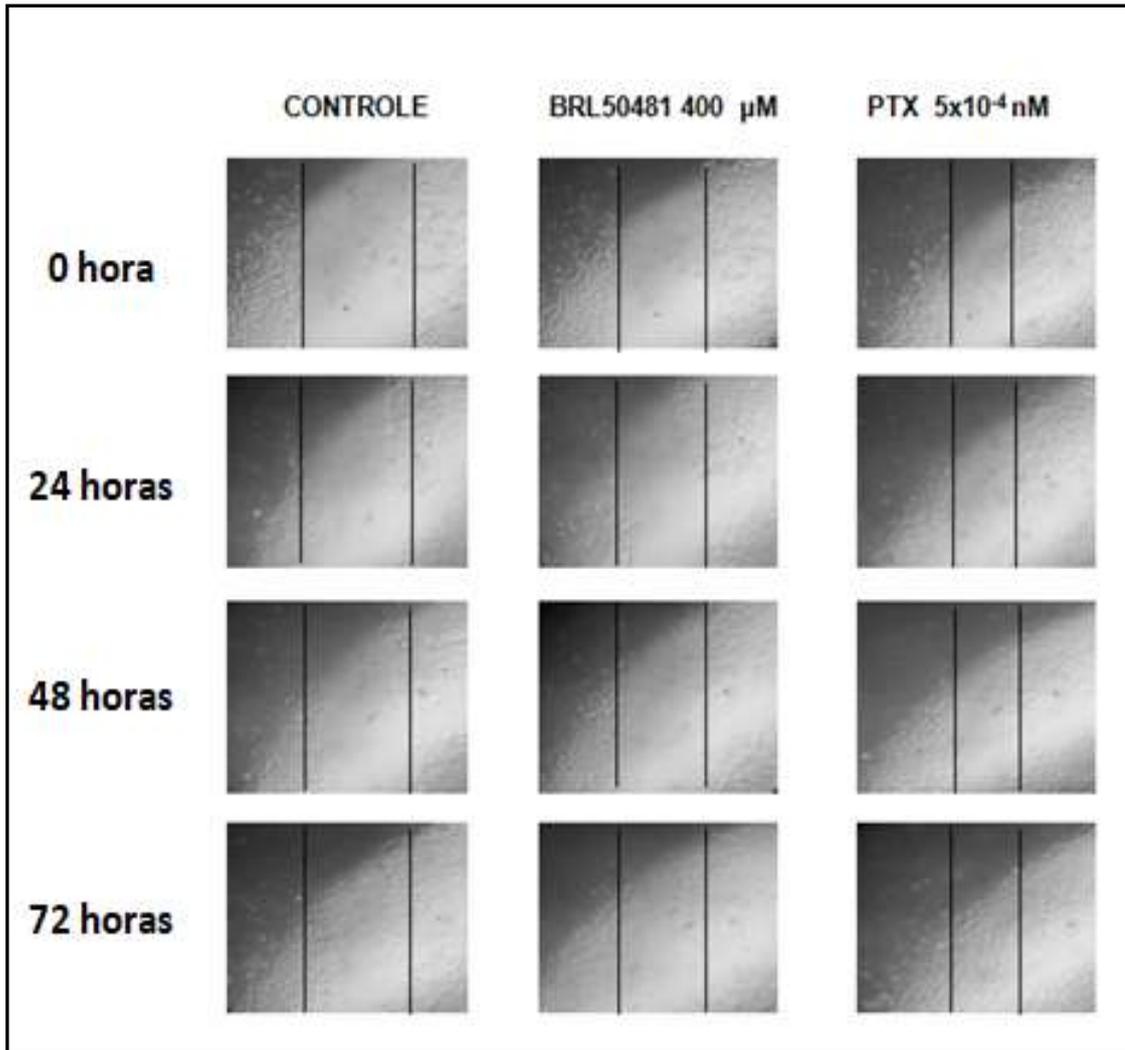


Figura 47: Ensaio de migração celular na linhagem OVCAR3.

Células da linhagem OVCAR3 foram semeadas na densidade $0,4 \times 10^6$ cel/mL e, após 24 h de aderência, incubadas com Mitomicina C por 2 h. Posteriormente, foi realizado o arranhão na monocamada celular e as células tratadas com BRL50481 e PTX, em monoterapia. O experimento foi acompanhado por 72h. Figura representativa de um experimento. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas

O mesmo foi observado para a linhagem OVCAR3. O tratamento com PTX na concentração de 5×10^{-4} nM não inibiu a migração celular e as células ainda apresentaram uma maior taxa de migração quando comparado ao controle e ao tratamento com 400 µM de BRL50481 nos tempos de tratamento de 48 e 72h (FIGURA 47).

Nesse íterim, MCKENZIE et al. (2011) usando o biossensor de PKA direcionado à membrana plasmática, pmAKAR3, mostraram que PKA é ativado primeiramente nas células migratórias de CAOV SKOV-3 e que a inibição da atividade da PKA bloqueia a migração das mesmas. Além disso, os autores demonstraram que, enquanto a atividade de PKA nesse contexto é mediada pela ancoragem das subunidades

reguladoras do tipo II, a inibição da ancoragem das subunidades RI ou RII de PKA bloqueia a migração celular.

Embora não tenha sido mensurado a atividade de PKA nas linhagens de CAO V estudadas após o tratameto com o inibidor de PDE7, estudos mostraram que inibidores específicos ou inespecíficos de fosfodiesterases podem aumentar os níveis de cAMP e, assim, a atividade de PKA (AHMAD *et al.*, 2015).

Dessa forma, a regulamentação dos níveis de cAMP intracelular e da PKA variam amplamente com o tipo de celular e o ambiente (HOWE, 2004). E a via canônica cAMP/PKA além de regular a dinâmica dos microfilamentos de actina, também desempenham papéis importantes na regulação de outros elementos da citoarquitetura, incluindo os filamentos intermediários por meio da fosforilação da queratina (ECKERT; YEAGLE, 1900), da vimentina (GARD; LAZARIDES, 1982) e da desmina (INAGAKI *et al.*, 1988) e dos microtúbulos pela fosforilação de MAP-2 (THEURKAUF; VALLEE, 1983) e estatimina (GRADIN *et al.*, 1998).

Além disso, a degradação e o remodelamento da matriz extracelular são estágios essenciais na migração, invasão e metástase das células tumorais. Esses processos são principalmente mediados por dois tipos de enzimas proteolíticas, a saber: componentes do sistema ativador do plasminogênio e as metaloproteinases da matriz (MMPs) (BOZZUTO *et al.*, 2010; STETLER-STEVENSON *et al.* 1993). As MMPs pertencem a uma família de endopeptidases dependentes de zinco capazes de degradar componentes da membrana basal e da matriz extracelular e geralmente são encontradas superexpressas em células tumorais e facilitam a migração *in vitro* (FRIEDL; WOLF, 2003).

Assim, por meio de experimentos de análise de expressão gênica poderemos verificar se a inibição de PDE7 modula a expressão das MMPs 2 e 9, sabidamente com expressão elevada em carcinoma ovariano (BELOTTI *et al.*, 2003).

5.15 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA PDE7 NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V

O ensaio de formação de colônias é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* tendo com base a capacidade de uma única célula crescer em uma colônia. O

ensaio avalia a capacidade de cada célula dentro de uma população de sofrer divisão ilimitada (FRANKEN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o agente BRL50481 em monoterapia inibiu a formação de colônias em ambas linhagens analisadas quando comparado ao controle. O mesmo foi observado nas células pré-tratadas com o inibidor de PDE7 seguido do tratamento com associação de BRL50481 e PTX. Esta condição de tratamento também promoveu diminuição na formação da colônias comparado ao controle e aos tratamentos com BRL50481 e PTX, em monoterapia, nas linhagens analisadas (FIGURA 48 A e B).

Observou-se também que, tanto para a linhagem A2780 quanto para a linhagem OVCAR3, os tratamento utilizando PTX na concentração da IC_{50} e a associação entre BRL50481 e PTX na IC_{50} inibiram completamente a formação de colônias. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas foram tóxicas para a finalidade do experimento.

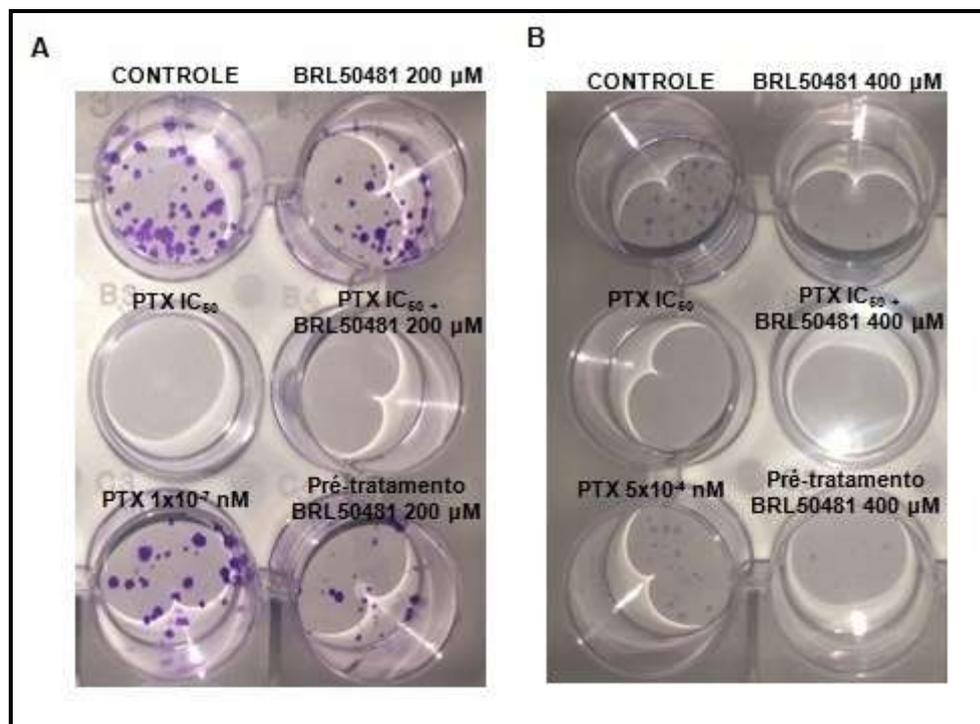


Figura 48: Ensaio de formação de colônia.

Células das linhagens (A) A2780 e (B) OVCAR3 foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com o inibidor de BRL50481 e PTX, em monoterapia, BRL50481 e PTX em associação e pré-tratadas com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX. Os experimentos foram acompanhados por 10 dias e realizados em três réplicas biológicas. Figura representativa de um experimento.

5.16 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CLDN-16 EM AMOSTRAS DE CAO V

A expressão de CLDN-16 foi avaliada através da técnica de imunohistoquímica em amostras de CAO V primários dispostas em plataformas de tissue array construída em nosso laboratório. Como controle positivo, foi utilizado a porção distal da alça de henle do rim de camundongo. Das 55 amostras analisadas, 80% foram positivas (44 amostras) para CLDN-16. Do total de casos positivos para CLDN-16, todos apresentaram expressão anômala de CLDN-16, ou seja, a mesma não manteve sua expressão membranar e foi encontrada restrita ao citoplasma das células. Apenas 13% dos casos analisados apresentaram reforço de CLDN-16 na membrana plasmática (FIGURA 49). Conforme discutido acima, CLDN-16 desempenha importantes papéis na manutenção da polaridade celular, adesão, transporte e permeabilidade iônica (HOU *et al.*, 2008). Além disso, CLDN-16 já foi encontrada com expressão aumentada no carcinoma papilar da tireóide (FLUGE *et al.*, 2006) e no câncer de mama (KUO *et al.*, 2010).

A expressão anômala de CLDN-16 foi independente do grau de estadiamento do tumor, porém observamos uma predominância nos estadiamentos III e IV (Estadiamento I-5 %; II-9 %; III-52 % e IV-34 %). Considerando a classificação histológica das amostras analisadas, o tipo histológico que apresentou maior expressão de CLDN-16 foi o subtipo seroso de alto grau (43%), seguido do tipo mucinoso e o de células claras, ambos correspondendo a 14% dos casos. O restante dos casos foram classificados como borderline (11%), endometrióide (7%) e adenocarcinoma não-específico (11%).

A participação da CLDN-16 no carcinoma ovariano ainda não é clara. Estudos adicionais não necessários para melhor elucidação do papel funcional da mesma do citoplasma da célula bem como a sua localização no citoplasma e estruturas associadas.

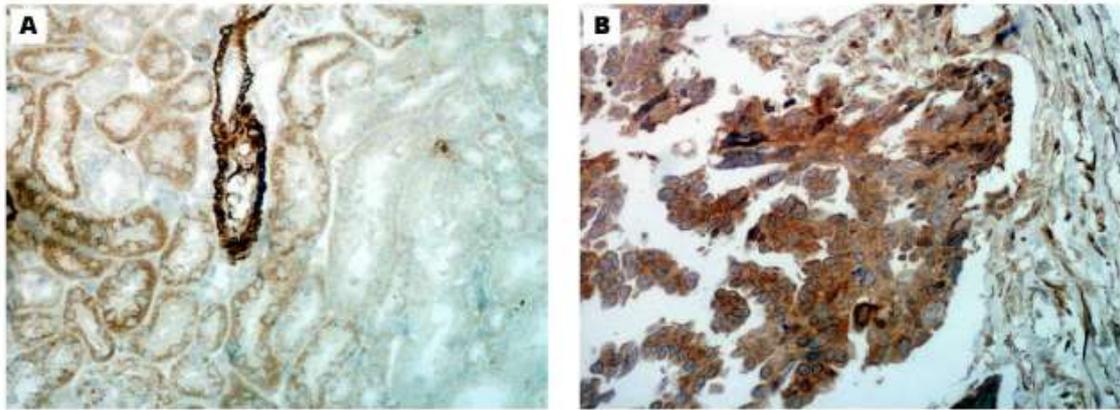


Figura 49: Análise da expressão de claudina-16 no CAOV em plataformas de tissue array por imunohistoquímica. (A) Controle positivo (rim camundongo). (B) Carcinoma seroso de alto grau.

5.17 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 NA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Interessados em avaliar se a inibição da PDE7 poderia alterar a morfologia celular, as células das linhagens A2780 e OVCAR3 foram pré-tratadas com BRL50481 por 24 h e posteriormente tratadas com a associação de BRL50481 e PTX por 24 h. Conforme observou-se na FIGURA 50D, o pré-tratamento da linhagem A2780 com o inibidor de PDE7 promoveu uma drástica alteração na morfologia das células quando comparado ao controle (células tratadas com DMSO- diluente da droga). As células adquiriram um formato esférico, característico de célula em lise celular.

Já na linhagem OVCAR3, o pré-tratamento promoveu alterações mais sutis na morfologia das mesmas quando comparado ao controle (FIGURA 50B).

Esse resultado vem ao encontro ao obtido pelo ensaio de VCM, no qual a linhagem A2780 se mostrou mais sensível ao pré-tratamento com BRL50481 quando comparado à linhagem OVCAR3 (FIGURAS 19 e 22).

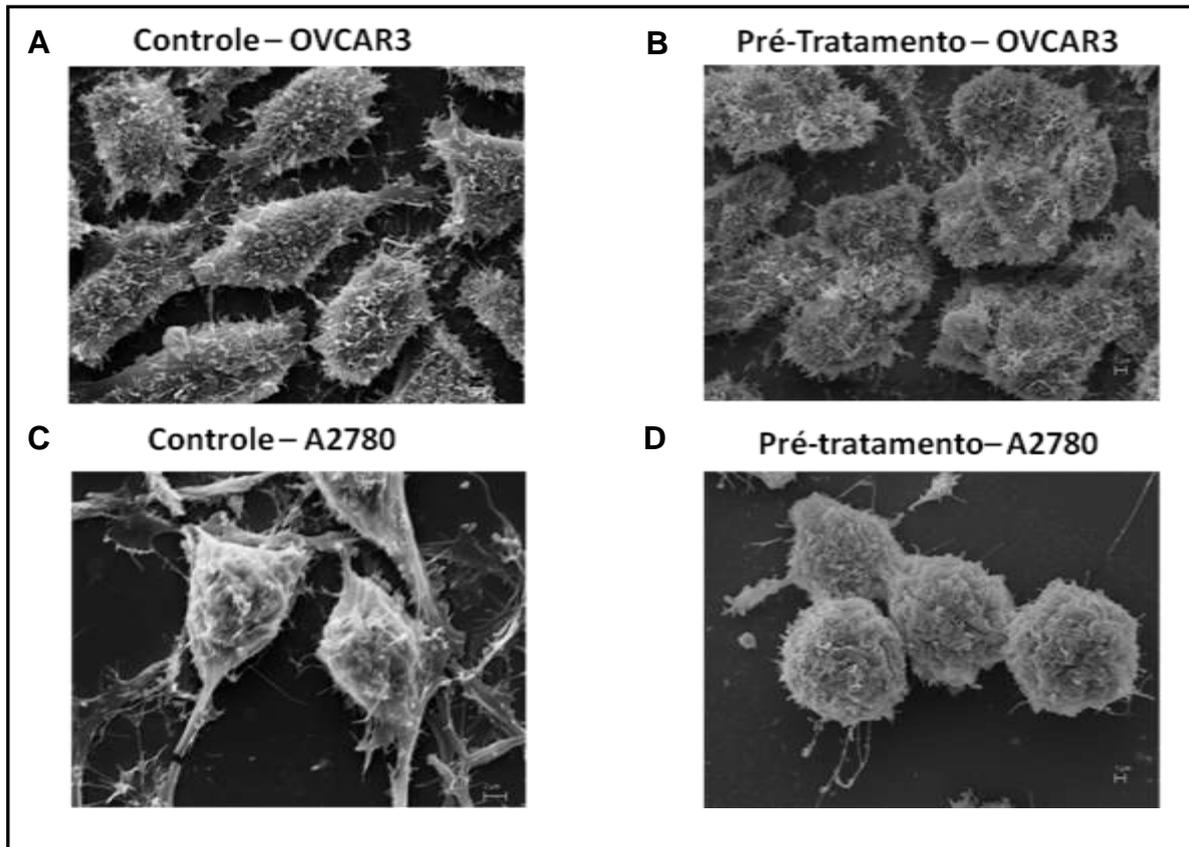


Figura 50: Ensaio de microscopia eletrônica de varredura nas linhagens de CAO. Células das linhagens OVCAR3 (A e B) e A2780 (C e D) foram semeadas na densidade $0,4 \times 10^6$ cel/mL em placas de 12 poços sob lamínula própria e pré-tratadas com BRL50481 por 24 h seguido do tratamento com BRL50481 associado ao PTX por 24 h. Foi realizada uma réplica biológica. As imagens foram analisadas utilizando o microscópio modelo ZEISS XVP EVO.

5.18 EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE7 POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Motivados em avaliar se a inibição da PDE7 poderia alterar morfológicamente as estruturas celulares, visto que tanto o tratamento em monoterapia com BRL50481 quanto o pré-tratamento promoveram aumento da expressão de duas importantes moléculas envolvidas nas vias de morte celular por autofagia e apoptose, beclina-1 e bax, respectivamente.

Assim, as células da linhagem A2780 foram tratadas com BRL50481 $200 \mu\text{M}$ em 6 h, PTX 1×10^{-7} nM em 24 h e pré-tratadas com BRL50481 $200 \mu\text{M}$ em 24h seguido do tratamento com BRL50481 $200 \mu\text{M}$ associado de 1×10^{-7} nM de PTX. O tratamento com PTX 1×10^{-7} nM promoveu aumento do número de retículo endoplasmático no citoplasma quando comparado ao controle (FIGURA 51B). Já o tratamento com BRL50481 promoveu alterações na morfologia das mitocôndrias bem como nas

cristas mitocondriais (FIGURA 51C). O pré-tratamento das células também promoveu alterações no formato das mitocôndrias e alargamento das cristas mitocondriais quando comparado ao controle (FIGURA 51 D).

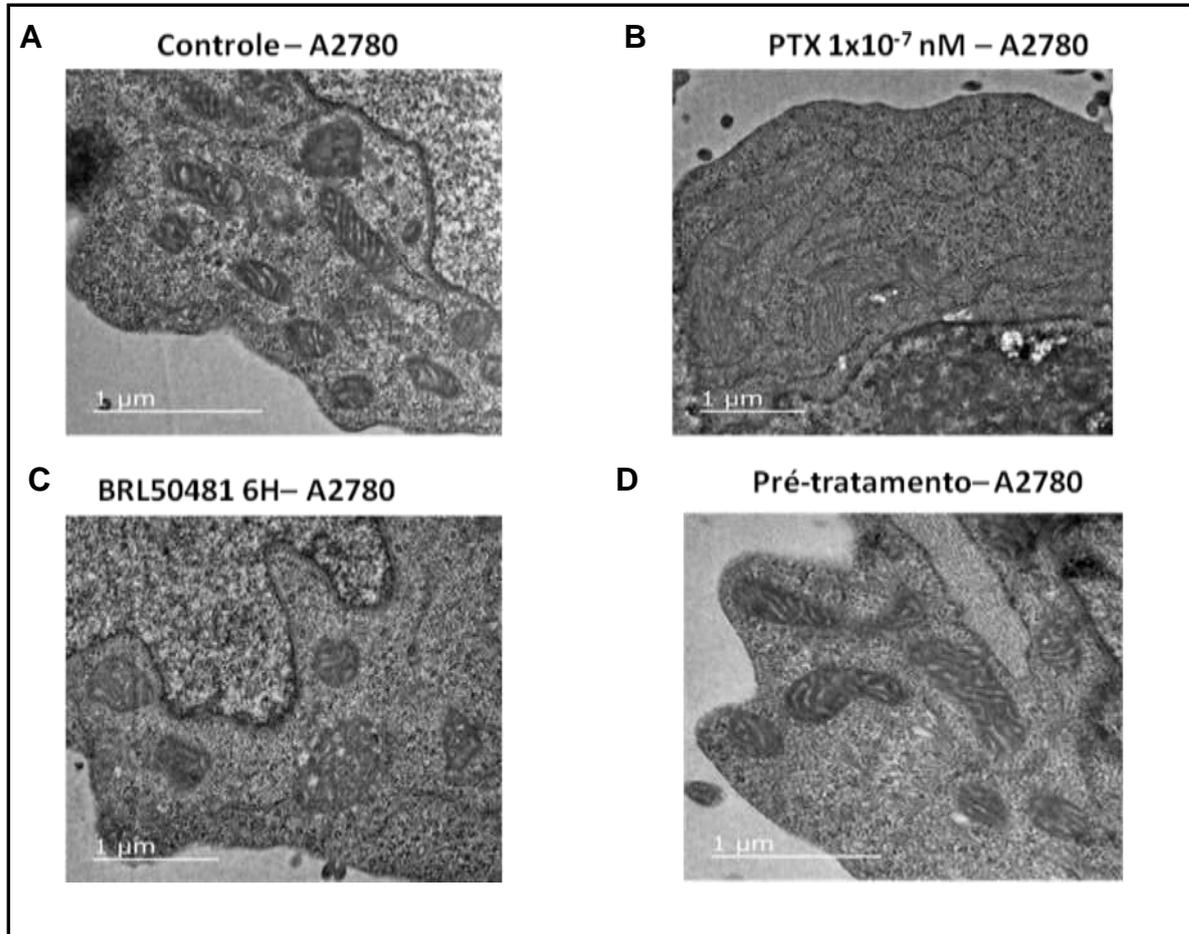


Figura 51: Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão nas linhagens de CAO. Células das linhagens A2780 foram semeadas na densidade $0,4 \times 10^6$ cel/mL em placas de 12 poços e tratadas com DMSO em 24h (A), PTX 1×10^{-7} nM 24 h (B), 200 μ M BRL50481 em 6 h (C) e pré-tratadas com BRL50481 por 24 h seguido do tratamento com BRL50481 associado ao PTX por 24 h (D). Foi realizada uma réplica biológica. As imagens foram analisadas utilizando o microscópio modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

Na linhagem OVCAR3, o tratamento com PTX na concentração 5×10^{-4} nM não promoveu alterações drásticas visíveis na morfologia das organelas. No entanto, é perceptível um aumento no número de mitocôndrias no citoplasma quando comparado ao controle (FIGURA 52B). Esse experimento faz necessário realizar com concentrações maiores de PTX para melhor compreender o papel do quimioterápico. Já o tratamento com 400 μ M BRL50481 promoveu alterações na morfologia das mitocôndrias bem como nas cristas mitocondriais com alargamento das mesmas (FIGURA 52C). O pré-tratamento das células também promoveu

alterações no formato das mitocôndrias e alargamento das cristas mitocôndrias quando comparado ao controle (FIGURA 51 D). Também observou-se maior associação do retículo endoplasmático com as mitocôndrias e a presença de possíveis corpos apoptóticos que precisam ser melhor investigados.

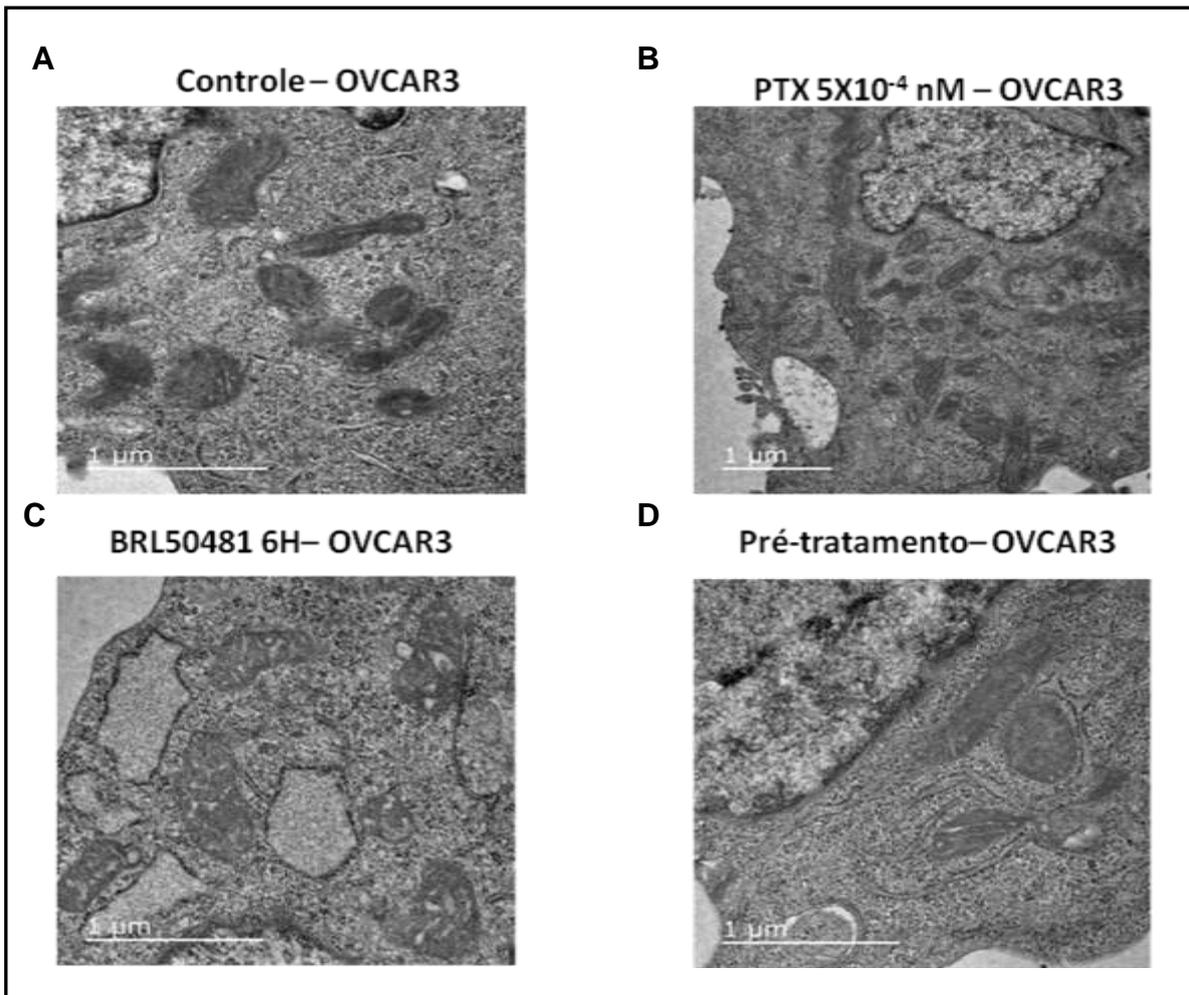


Figura 52: Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão nas linhagens de CAO. Células das linhagens OVCAR3 foram semeadas na densidade $0,4 \times 10^6$ cel/mL em placas de 12 poços e tratadas com DMSO em 24h (A), PTX 5×10^{-4} nM 24 h (B), $400 \mu\text{M}$ BRL50481 em 6 h (C) e pré-tratadas com BRL50481 por 24 h seguido do tratamento com BRL50481 associado ao PTX por 24 h (D). Foi realizada uma réplica biológica. As imagens foram analisadas utilizando o microscópio modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

6. CONCLUSÃO

O nosso estudo mostrou a descoberta de um alvo inédito no carcinoma de ovário a partir dos dados de RNA-seq denominado PDE7-A. Ademais, a associação do inibidor de PDE7 ao quimioterápico paclitaxel é potencialmente benéfica na redução da proliferação celular. Além disso, a cronologia do tratamento se apresentou de extrema importância para a redução da viabilidade celular metabólica, com concomitante diminuição na concentração de paclitaxel.

Um dos principais desafios no desenvolvimento de novos regimes quimioterápicos é a citotoxicidade e os taxanos apresentam, entre outros efeitos adversos, a neurotoxicidade. Assim, nossos resultados demonstraram a possibilidade de um novo tratamento no qual a concentração de paclitaxel utilizada foi menor que a preconizada na clínica.

Outrossim, a enzima PDE7 exerce um importante papel no microambiente tumoral ao modular a expressão das interleucinas IL-6, IL-1 α , IL- β e CXCL-2 bem como dos marcadores dos fenótipos de TEM e CTT.

Ademais, dentre os mecanismos de ação estudados, a inibição da isoforma de PDE7 promoveu a modulação negativa da via de PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK, contribuindo para regulação de importantes vias envolvidas na proliferação e diferenciação celular. Ainda, o uso do inibidor pode induzir morte celular tanto por apoptose, autofagia quanto necrose.

Também foi observada expressão anômala do marcador CLDN-16 em amostras de CAO. A expressão dessa proteína é modulada por diferentes vias de sinalização celular, a saber: PKC, PI3K/AKT/mTOR e PKA. A fosforilação da proteína CLDN-16 nas JO pode contribuir para o aumento da sua expressão e, conseqüente, localização anômala no citoplasma.

Estudos adicionais fazem-se necessários para melhor elucidação do papel da PDE7 no carcinoma ovariano.

7. PERSPECTIVAS

- Normalizar e quantificar novamente os *imunoblots* das proteínas beclina-1 e claudina-16 que foram normalizados com a proteína β -actina;
- Mensurar a atividade de PKA após o tratamento com o inibidor de PDE7 em monoterapia e em associação à CISP e ao PTX em ambos os modelos de carcinoma de ovário estudados;
- Dosagem curso temporal das citocinas IL-1 β e IL-6 no sobrenadante das células da linhagem OVCAR3;
- Analisar a expressão gênica de um painel dos marcadores de TEM, a saber: CLDN-3, CLDN-4, E-caderina, N-caderina e Twist nas linhagens de CAO V A2780 e OVCAR3 após o tratamento com BRL50481 em monoterapia e em associação ao PTX;
- Investigar a modulação das vias de sinalização STAT3 nas linhagens celulares de CAO V A2780 e OVCAR3 após o tratamento com BRL50481 em monoterapia e em associação ao PTX;
- Análise da expressão gênica das MMPs 2 e MMPs 9 após o tratamento das células das linhagens A2780 e OVCAR3 com o inibidor de PDE7;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com BRL50481 seguido do tratamento com BRL50481 e PTX na migração celular.
- Síntese química do inibidor de PDE7 e avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Roshan; KAYE, Stan B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, v. 3, n. 7, p. 502–16, 2003.
- AHMAD, F. *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Diseases*, v. 21, n. 1, p. e25–e50, 2015.
- AL-HAJJ, M *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, v. 100, p. 3983–3988, 2003.
- ALISON, MR *et al.* Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev*, v. 38, p. 589–98, 2012.
- ALLISON, AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*, v. 47, p. 63–83, 2000.
- ALPER, O; HACKER, N F; CHO-CHUNG, Y S. Protein kinase A- α subunit-directed antisense inhibition of ovarian cancer cell growth: crosstalk with tyrosine kinase signaling pathway. *Oncogene*, v. 18, n. 35, p. 4999–5004, 1999.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. *Facts & Figure 2017*, p. 1–76, 2017.
- ANDREWS, PA *et al.* Cis-Diamminedichloroplatinum (II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, v. 48, p. 68–73, 1988.
- APTE, Ron N. *et al.* The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer and Metastasis Reviews*, NULL, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2006.
- BAILLIE, George S.; SCOTT, John D.; HOUSLAY, Miles D. Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: Opposites attract. *FEBS Letters*, v. 579, n. 15, p. 3264–3270, 2005.
- BAILLY, M.; CONDEELIS, J. Cell motility: insights from the backstage. *Nat. Cell Biol*, v. 4, p. E292–E294, 2002.
- BAPAT, SA. Human ovarian cancer stem cells. *Reproduction*, v. 140, p. 33–41, 2010.
- BARTHOLOMEUSZ, C.; GONZALEZ-ANGULO, A.M. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 16, n. 1, p. 121–30, 2012.
- BAST, RC Jr *et al.* A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, v. 309, p. 883–887., 1983.
- BEAUFORT, Corine M. *et al.* Ovarian cancer cell line panel (OCCP): Clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, 2014.
- BEAVO, J.A.; BRUNTON, L.L. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v. 3, p. 710, 2002.
- BEIER, D *et al.* CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, v. 67, p. 4010–5, 2007.
- BELLACOSA, A *et al.* Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, v. 64, n. 4, p. 280–5, 1995.
- BELOTTI, D *et al.* Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res*, v. 63, p. 5224–9, 2003.
- BELPERIO, J.A.; ET AL. CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, v. 68, n. 1, p. 1–8, 2000.

- BENDER, Andrew T.; BEAVO, Joseph A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews*, v. 58, n. 3, p. 488–520, 2006.
- BEREK, JS *et al.* Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 164, p. 1038–1043, 1991.
- BERRY, D. L.; BAEHRECKE, E. H. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1137–1148, 2007.
- BLAY, J-Y *et al.* Serum level of interleukin-6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res*, v. 52, p. 3317–3322, 1992.
- BOER, B *et al.* Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res*, v. 35, p. 1773–86, 2007.
- BOOKMAN, MA *et al.* Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *J Clin Oncol*, v. 27, p. 1419–25, 2009.
- BOWTELL, D. D. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nature Rev. Cancer*, v. 10, p. 803–808, 2010.
- BOYD, J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol.*, v. 88, p. S8–S10, 2003.
- BOZZUTO, Giuseppina *et al.* Brain tumor stem cell dancing. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, v. 50, n. 3, p. 286–290, 2010.
- BRADFORD, M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRENNER, W. *et al.* Adhesion of renal carcinoma cells to endothelial cells depends on PKC μ . *BMC Cancer*, v. 10, p. 1–15, 2010.
- CAI, Guoqing *et al.* Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta at serine 9 confers cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *International journal of oncology*, v. 31, n. 3, p. 657–662, 2007.
- CALLAHAN, Michael J *et al.* Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 25, n. 25, p. 3985–90, 1 set. 2007.
- CAMPBELL, IG *et al.* Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*. *Cancer Research*, v. 64, p. 7678–81, 2004.
- CANNISTRA, SA. Cancer of the ovary. *J Med*, v. 351, p. 2519–2529, 2004.
- CAO, Feng *et al.* Identification of an essential molecular contact point on the duck hepatitis B virus reverse transcriptase. *Journal of ...*, v. 79, n. 16, p. 10164–10170, 2005.
- CAO, Qi; LU, Xin; FENG, You-Ji. Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell research*, v. 16, n. 7, p. 671–677, 2006.
- CARMI, Y. *et al.* The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *Journal of Immunology*, v. 183, n. 7, p. 4705–4714, 2009.
- CARNERO, Amancio; PARAMIO, Jesus M. The PTEN / PI3K / AKT pathway in vivo , cancer mouse models. v. 4, n. September, p. 1–10, 2014.
- CHANG, L; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v. 410, n. 6824, p. 37–40, 2001.
- CHANG, T-K *et al.* Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. *Nat Cell Biol.*, v. 15, n. 9, p. 1067–1078, 2013.

- CHEADLE, Chris *et al.* Regulatory subunits of PKA define an axis of cellular proliferation/differentiation in ovarian cancer cells. *BMC medical genomics*, v. 1, p. 43, 2008.
- CHEN, YC *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133- positive cells. *PLoS ONE*, v. 3, p. 1–14, 2008.
- CHENG, Y; ZHANG, G; LI, G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev*, v. 32, n. 3–4, p. 567–84, 2013.
- CHO-CHUNG, YS. Role of cyclic AMP receptor proteins in growth, differentiation, and suppression of malignancy: new approaches to therapy. *Cancer Res*, v. 50, n. 22, p. 7093–7100, 1990.
- CLARKE, MF *et al.* Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, v. 66, p. 9339–9344, 2006.
- COHEN, I. *et al.* “Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 6, p. 2574–2579, 2010.
- COLLINS, AT *et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, v. 65, p. 10946–10951., 2005.
- CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem*, v. 76, p. 481–511, 2007.
- CVIJIC, M E; YANG, W L; CHIN, K V. Cisplatin resistance in cyclic AMP-dependent protein kinase mutants. *Pharmacology & therapeutics*, v. 78, n. 2, p. 115–28, 1998.
- CVIJIC, Mary Ellen; CHIN, Khew Voon. Characterization of a cAMP-dependent protein kinase mutant resistant to cisplatin. *International Journal of Cancer*, v. 72, n. 2, p. 345–350, 1997.
- D’SOUZA, T; AGARWAL, R; MORIN, PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, v. 280, n. 28, p. 26233–26240, 2005.
- D’SOUZAA, Theresa; INDIGB, Fred E.; MORIN, Patrice J. Phosphorylation of Claudin-4 By PKC ϵ Regulates Tight Junction Barrier Function in Ovarian Cancer Cells. *Exp Cell Res*, v. 313, n. 15, p. 3364–3375, 2007.
- DAI, Yan *et al.* The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer. v. 8, n. 1, p. 1354–1368, 2016.
- DAVIDSON, Ben; TROPÉ, Claes G; REICH, Reuven. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Frontiers in oncology*, v. 2, n. April, p. 33, 2012.
- DE OLIVEIRA, SS *et al.* Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett*, v. 579, p. 6179–6185, 2005.
- DENKERT, C. *et al.* Cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs (CSAIDs) inhibit invasion and MMP-1 production of ovarian carcinoma cells. *Cancer Letters*, v. 195, n. 1, p. 101–109, 2003.
- DERRY, W. Brent *et al.* Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified α -tubulin isotypes. *Biochemistry*, v. 36, n. 12, p. 3554–3562, 1997.
- DIAZ-PADILLA, I *et al.* Ovarian low-grade serous carcinoma: a comprehensive update. *Gynecol Oncol*, v. 126, n. 2, p. 279–85, 2012.
- DIAZ, JF *et al.* [HTML] de jbc.org Molecular recognition of Taxol by microtubules kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent Taxol derivatives to an exposed site. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 26265–26276, 2000.

- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, NULL, v. 87, p. 2095–2147, 1996.
- DINARELLO, C. A. The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 25, n. 3, p. 307–313, 2006.
- DINARELLO, C. A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 29, n. 2, p. 317–329, 2010.
- DOBLE, BW; WOODGETT, JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, v. 116, p. 1175–1186, 2003.
- DONG, Hongli *et al.* Inhibition of PDE3, PDE4 and PDE7 potentiates glucocorticoid-induced apoptosis and overcomes glucocorticoid resistance in CEM T leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 3, p. 321–329, 2010.
- DOWER, K *et al.* Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, v. 180, p. 3520–3534, 2008.
- ECKERT, B.S.; YEAGLE, P.L. Modulation of keratin intermediate filament distribution in vivo by induced changes in cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Cell Motil. Cytoskeleton*, v. 17, p. 291–300, 1990.
- ELGENDY, Mohamed *et al.* Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival. *Molecular Cell*, v. 42, n. 1, p. 23–35, 2011.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*, v. 35, p. 495–516, 2007.
- ENGELMAN, JA; LUO, J; CANTLEY, LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 8, p. 606–19, 2006.
- ESCOBAR-SÁNCHEZ, María L; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Luis. *World â€™s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Steroidal Saponins and Cell Death in Cancer*. [S.l: s.n.], 2015.
- ESSAYAN, DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation. *Biochem Pharmacol*, v. 57, p. 965–73, 1999.
- FADER, AN *et al.* The prognostic significance of pre- and post-treatment CA-125 in grade 1 serous ovarian carcinoma: a gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, v. 132, n. 3, p. 560–5, 2014.
- FARLEY, J *et al.* Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*, v. 14, n. 2, p. 134–40., 2013.
- FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, v. 17, p. 375–412, 1963.
- FLUGE, O *et al.* Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid*, v. 16, p. 161–175, 2006.
- FRANKEN, Nicolaas A P *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.
- FRASER, M; BAI, T; TSANG, BK. Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function. *Int J Cancer*, v. 122, p. 534–46, 2008.
- FRASER, Michael *et al.* Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, v. 1, n. 1, p. 66, 2003.
- FRENCH, Amanda D. *et al.* PKC and PKA Phosphorylation Affect the Subcellular Localization of Claudin-1 in Melanoma Cells. *International Journal of Medical*

- Sciences*, v. 6, n. 2, p. 93–101, 2009.
- FRESNO VARA, J A *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, v. 30, n. 2, p. 193–204, 2004.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*, v. 3, p. 362–374, 2003.
- FUJITA, K *et al.* extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett*, v. 476, p. 258–261, 2000.
- GALLI, R *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, v. 64, p. 7011–7021, 2004.
- GARD, D.L.; LAZARIDES, E. Cyclic AMP-modulated phosphorylation of intermediate filament proteins in cultured avian myogenic cells. *Cell. Biol.*, v. 2, p. 1104–1114, 1982.
- GERSHENSON, DM *et al.* Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant. *Gynecol Oncol*, v. 114, n. 1, p. 48–52, 2009.
- GIEMBYCZ, M A; NEWTON, Robert. Harnessing the clinical efficacy of phosphodiesterase 4 inhibitors in inflammatory lung diseases: dual-selective PDE inhibitors and novel combination therapies. *Handb. Exp. Pharmacol.*, v. 204, p. 415–446, 2011.
- GOFF, BA *et al.* Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer*, v. 109, p. 221–227, 2007.
- GOFF, BA *et al.* Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*, v. 89, p. 2068–2075, 2000.
- GOLSTEIN, P; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, v. 32, p. 37–43, 2007.
- GONZALEZ-GARCIA, C. *et al.* Comparative assessment of phosphodiesterase 4 and 7 inhibitors as therapeutic agents in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Br. J. Pharmacol*, v. 170, p. 602–613, 2013.
- GONZALEZ-MARISCAL, L *et al.* Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, v. 81, n. 1, p. 1–44, 2003.
- GONZÁLEZ-MARISCAL, Lorenza; TAPIA, Rocio; CHAMORRO, David. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1778, n. 3, p. 729–756, 2008.
- GRADIN, H.M. *et al.* Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells. *J. Cell Biol*, v. 140, p. 131–141, 1998.
- GRIVENNIKOV, Sergei; KARIN, Michael. Autocrine IL-6 Signaling: A Key Event in Tumorigenesis? *Cancer Cell*, v. 13, n. 1, p. 7–9, 2008.
- GROSS, A *et al.* Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo Journal*, v. 17, n. 14, p. 3878 ± 3885, 1998.
- GUIMARÃES, Isabella S *et al.* Targeting the PI3K / AKT / mTOR Pathway in Cancer Cells. [S.l: s.n.], 2015. .
- GUO, Yaxiong *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 is associated with the effect of claudin-6 in breast cancer. *Diagnostic pathology*, v. 7, n. 1, p. 111, jan. 2012.
- HAN, P; ZHU, XY; MICHAELI, T. Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart. *J Biol Chem*, v. 272, p. 16152–16157, 1997.
- HAN, Ping *et al.* PDE7A1, a cAMP-specific phosphodiesterase, inhibits cAMP-dependent protein kinase by a direct interaction with C. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 22, p. 15050–15057, 2006.
- HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N.*

- Engl. J. Med.*, v. 352, n. 16, p. 1685–1695, 2005.
- HAO, Yanzhang *et al.* OPN Polymorphism Is Related to the Chemotherapy Response and Prognosis in Advanced NSCLC. v. 2014, 2014.
- HASSAN, Mohamed *et al.* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.
- HEERBOTH, S. *et al.* The use of epigenetic drugs in diseases: An overview. *Genet. Epigenet*, v. 6, p. 9–19, 2014.
- HENDERSON, D J P *et al.* The cAMP phosphodiesterase-4D7 (PDE4D7) is downregulated in androgen-independent prostate cancer cells and mediates proliferation by compartmentalising cAMP at the plasma membrane of VCaP prostate cancer cells. *British journal of cancer*, v. 110, n. 5, p. 1278–87, 2014.
- HENNESSY, BT *et al.* Ovarian cancer. *Lancet*, v. 374, p. 1371–82, 2009.
- HIBI, M *et al.* Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, v. 63, p. 1149–57., 1990.
- HICHINO, Asami *et al.* Down-regulation of claudin-2 expression and proliferation by epigenetic inhibitors in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 6, p. 2411–2421, 2017.
- HIRANO, T.; NAKAJIMA, K; HIBI, M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 8, p. 241--252, 1997.
- HIRSH, Liron *et al.* Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. *Biochemical pharmacology*, v. 68, n. 6, p. 981–8, 2004.
- HOGGARD, John *et al.* Claudin-7 increases chemosensitivity to cisplatin through the upregulation of caspase pathway in human NCI-H522 lung cancer cells. *Cancer science*, v. 104, n. 5, p. 611–8, maio 2013.
- HOU, Jianghui *et al.* Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *The Journal of clinical investigation*, v. 118, n. 2, p. 619–28, fev. 2008.
- HOU, Jianghui *et al.* Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 36, p. 15350–5, 8 set. 2009.
- HOU, JY *et al.* Exploiting MEK inhibitor-mediated activation of ERalpha for therapeutic intervention in ER-positive ovarian carcinoma. *PLoS One*, v. 8, n. 2, p. e54103, 2013.
- HOUSLAY, M. D.; BAILLIE, G. S.; MAURICE, D. H. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ. Res*, v. 100, p. 950–966, 2007.
- HOUSLAY, M.D.; ADAMS, D.R. PDE4 cAMP phospho- diesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross- talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J*, v. 370, p. 1, 2003.
- HOUSLAY, MD; SCHAFFER, P; ZHANG, KY. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today*, v. 10, p. 1503–19, 2005.
- HOUSMAN, Genevieve *et al.* Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 2014.
- HOWE, Alan K. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1692, n. 2–3, p. 159–174, 2004.
- HOWELL, S. B. *et al.* Biochemical modulation of cisplatin by dipyridamol. 1987, [S.l.: s.n.], 1987. p. 228–234.
- HSIEH, Y.-H. *et al.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Involved in Protein Kinase C -Regulated Invasion in Human Hepatocellular Carcinoma Cells.

- Cancer Research*, v. 67, n. 9, p. 4320–4327, 2007.
- HU, L *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 30-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res*, v. 62, p. 87–92, 2002.
- HU, Limin *et al.* Inhibition of Phosphatidylinositol 3 ' -Kinase Increases Efficacy of Paclitaxel in in Vitro and in Vivo Ovarian Cancer Models Inhibition of Phosphatidylinositol 3 -Kinase Increases Efficacy of Paclitaxel in in Vitro and in Vivo Ovarian Cancer Models 1. *Cancer research*, v. 62hu, p. 1087–1092, 2002.
- IKARI, A *et al.* Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase a independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway. *J Cell Physiol.*, v. 214, n. 1, p. 221–9, 2008.
- INAGAKI, M. *et al.* Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 5970–5978, 1988.
- JACINTO, E *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, v. 6, p. 1122–1128, 2004.
- JANES, K.A.; ET AL. A systems model of signaling identifies a molecular basis set for cytokine-induced apoptosis. *Science*, v. 310, n. 5754, p. 1646–1653, 2005.
- JAPAN SOCIETY OF GYNECOLOGIC ONCOLOGY. *Ovarian cancer treatment guideline 2010*. Tokyo, Kanehara: [s.n.], 2010.
- JELOVAC, Danijela; ARMSTRONG, Deborah K. Recent Progress in the Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. v. 61, n. 3, p. 183–203, 2011.
- JIAN, Yuekui *et al.* Delocalized Claudin-1 promotes metastasis of human osteosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 466, n. 3, p. 356–361, 2015.
- JING-JU, PAN *et al.* Activation of Akt/GSK3 β and Akt/Bcl-2 signaling pathways in nickel-transformed BEAS-2B cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, v. 39, p. 1285–1294, 2011.
- JONES, Valerie Sloane *et al.* Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1865, n. 2, p. 255–265, 2016.
- JOPE, RS; JOHNSON, GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*, v. 29, p. 95–102, 2004.
- JURGENSMEIER, J. M. *et al.* Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 9, p. 4997–5002, 1998.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, v. 119, p. 1420–1428, 2009.
- KANDOTH, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, v. 502, n. 7471, p. 333–339, 2013.
- KAPKA-SKRZYPCZAK, Lucyna *et al.* Effect of IL-6 and IL-8 on the expression of the complement activation inhibitors MAC-inhibitory protein and decay-accelerating factor in ovarian cancer A2780 cells. *Oncology Letters*, v. 12, n. 2, p. 1507–1512, 2016.
- KELLAND, Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.
- KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br. J. Pharmacol.*, v. 165, p. 1288–1305, 2012.

- KIGAWA, J *et al.* Gamma-glutamyl cysteine synthetase up-regulates glutathione and multidrug resistance-associated protein in patients with chemoresistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, v. 4, p. 1737–41, 1998.
- KIGAWA, J. New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago Acta Medica*, v. 56, n. 2, p. 43–50, 2013.
- KILEY, SC *et al.* Protein kinase C delta involvement in mammary tumor cell metastasis. *Cancer Res*, v. 59, n. 13, p. 3230–8, 1999.
- KIM, A. *et al.* Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 31, n. 1, p. 14, 2012.
- KIM, SH; JUHNN, YS; SONG, YS. Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1095, p. 82–89, 2007.
- KINROSS, KM; MONTGOMERY, KG KLEINSCHMIDT, M; *et al.* An activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian tumorigenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 2, p. 553–557, 2012.
- KINROSS, KM; MONTGOMERY, KG; *et al.* An activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*, v. 122, n. 2, p. 553–7, 2012.
- KOIZUMI, J. *et al.* Protein kinase C enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. *Molecular pharmacology*, v. 74, n. 2, p. 432–442, 2008.
- KRAUSE, Gerd *et al.* Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1778, n. 3, p. 631–645, 2008.
- KRITZER, M. D. *et al.* AKAPs: the architectural underpinnings of local cAMP signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol*, v. 52, p. 351–358, 2012.
- KRYCZEK, I *et al.* IL-6 production in ovarian carcinoma is associated with histotype and biological characteristics of the tumour and influences local immunity. *British journal of cancer*, v. 82, p. 621–628, 2000.
- KUO, S *et al.* Significant elevation of CLDN16 and HAPLN3 gene expression in human breast cancer. n. 110, p. 759–766, 2010.
- KURMAN, RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*, v. 24, p. 16–21, 2013.
- KURMAN, Robert J.; SHIH, Ie-Ming. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis : Revisited, Revised, and Expanded. *The American Journal of Pathology*, v. 186, n. 4, p. 733–747, 2016.
- KYUNO, D. *et al.* Protein kinase C inhibitor protects against downregulation of claudin-1 during epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 6, p. 1232–1243, 2013.
- LADDHA, S. V. *et al.* Mutational Landscape of the Essential Autophagy Gene BECN1 in Human Cancers. *Mol Cancer Res*, v. 12, n. 4, p. 485–490, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEE, K. R. & YOUNG, R. H. The distinction between primary and metastatic mucinous carcinomas of the ovary: gross and histologic findings in 50 cases. *J. Surg. Pathol.*, v. 27, p. 281–292, 2003.
- LEE, CS *et al.* Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Pharmacol*, v. 623, p. 7–13, 2010.
- LEE, KR *et al.* CHAPTER 2 WHO histological classification of tumours of the ovary. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. [S.l: s.n.], 2003. p. 117–45.
- LEWIS, A. M. *et al.* Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of

- interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*, v. 4, n. 48, 2006.
- LI, Honglin *et al.* Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, v. 94, n. 4, p. 491–501, 1998.
- LI, Jie *et al.* Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis. *Journal of hematology & oncology*, v. 5, n. 1, p. 8, 2012.
- LI, T; WANG, G. Computer-aided targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway: toxicity reduction and therapeutic opportunities. *Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 15, p. 18856–91, 2014.
- LIANG, XH *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, v. 402, p. 672–6, 1999.
- LIN, D.; ET AL. Genomic and functional characterizations of phosphodiesterase subtype 4D in human cancers. *Proc. Natl Acad. Sci*, v. 110, p. 6109–6114, 2013.
- LIN, Huan Xin *et al.* Decreased Expression of Beclin 1 Correlates Closely with Bcl-xL Expression and Poor Prognosis of Ovarian Carcinoma. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, 2013.
- LING, K.S. *et al.* MECHANISMS INVOLVED IN CHEMORESISTANCE IN OVARIAN CANCER Kar-San. *Taiwanese J Obstet Gynecol*, v. 44, n. 3, p. 209–217, 2005.
- LIPPOLDT, A *et al.* Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport*, v. 11, n. 7, p. 1427–1431, 2000.
- LUDWIG, H *et al.* Interleukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, v. 77, p. 2794–2795, 1991.
- LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, v. 109, p. 366–398, 2005.
- LUO, L *et al.* Effects of the TREM-1 pathway modulation during empyema in rats. *Chin Med J (Engl)*, v. 123, p. 1561–1565, 2010.
- LUO, Zhongyue *et al.* Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? *Cancer Letters*, v. 377, n. 2, p. 174–182, 2016.
- MAGALHÃES, J P. How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, p. 357–365, 2013.
- MANDIL, Revital *et al.* Protein Kinase C α and Protein Kinase C δ Play Opposite Roles in the Proliferation and Apoptosis of Glioma Cells Protein Kinase C ζ and Protein Kinase C η Play Opposite Roles in the Proliferation. *Cancer*, n. 26, p. 4612–4619, 2001.
- MANNING, BD; CANTLEY, LC. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends of Biochemical Sciences*, v. 28, n. 11, p. 573–6, 2003.
- MANSOUR, SJ *et al.* Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, v. 265, p. 966–970, 1994.
- MARCHINI, Sergio *et al.* Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. p. 520–530, 2013.
- MARKMAN, M *et al.* Responses to second-line cisplatin-based intraperitoneal therapy in ovarian cancer: influence of a prior response to intravenous cisplatin. *J Clin Oncol*, v. 9, p. 1801–1805, 1991.
- MARTIN, TA; JIANG, WG. Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol Histopathol*, v. 16, p. 1183–95, 2001.
- MATTER, Karl; BALDA, Maria S. Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 4, n. 3, p. 225–36, mar. 2003.
- MAURICE, Donald H. *et al.* Advances in targeting cyclic nucleotide

- phosphodiesterases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 4, p. 290–314, 2014.
- MCCLUGGAGE, W Glenn. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*, v. 43, n. 5, p. 420–32, ago. 2011.
- MCCUBREY, JA *et al.* Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. *Oncotarget Oct*, v. 3, n. 10, p. 1068–111, 2012.
- MCGUIRE, WP *et al.* Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N. Engl. J. Med*, v. 334, p. 1–6, 1996.
- MCKENZIE, Andrew J.; CAMPBELL, Shirley L.; HOWE, Alan K. Protein kinase a activity and anchoring are required for ovarian cancer cell migration and invasion. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, 2011.
- MEIJERA, AF; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, n. 12, p. 2445–2462, 2004.
- MODUGNO, Francesmary; EDWARDS, Robert P. Ovarian cancer: prevention, detection, and treatment of the disease and its recurrence. Molecular mechanisms and personalized medicine meeting report. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, v. 22, n. 8, p. S45-57, out. 2012.
- MOON, Eunyi *et al.* Inhibition of PDE3B Augments PDE4 Inhibitor-induced Apoptosis in a Subset of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Inhibition of PDE3B Augments PDE4 Inhibitor-induced Apoptosis in a Subset of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia 1. v. 8, n. February, p. 589–595, 2002.
- MOOS, PJ; FITZPATRICK, FA. Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits. *Cell Growth Differ.*, v. 9, p. 687–697, 1998.
- MORALES-GARCIA, J. A. REDONDO, M. *et al.* Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *PLoS One*, v. 6, p. e17240, 2011.
- MORALES-GARCIA, Jose A. *et al.* Crosstalk between phosphodiesterase 7 and glycogen synthase kinase-3: Two relevant therapeutic targets for neurological disorders. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 5, n. 3, p. 194–204, 2014.
- MORIN, Patrice J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer research*, v. 65, n. 21, p. 9603–6, 1 nov. 2005.
- MOSER, B; ET AL. Chemokines:multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.*, v. 25, n. 2, p. 75–84, 2004.
- MUKOHARA, T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer*, v. 7, p. 111–23, 2015.
- MULLIN, JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool*, v. 279, p. 484–9., 1997.
- MURATA, K *et al.* Cyclic AMP specific phosphodiesterase activity and colon cancer cell motility. *Clinical & experimental metastasis*, v. 18, n. 7, p. 599–604, 2000.
- NAKASHIMA, Shigeru. JB Minireview-Protein Kinase C Isoforms and Their Specific Function Protein Kinase Shigeru Ca Regulation and Biological Function The implication of PKC in cell growth was first demonstrated stimulated. 2002.
- NALDINI, A. *et al.* Interleukin-1beta regulates the migratory potential of MDAMB231 breast cancer cells through the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur. J. Cancer*, v. 46, p. 3400–3408, 2010.

- NASH, M.A *et al.* The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr. Relat. Cancer*, NULL, v. 6, p. 93–107, 1999.
- NAVIGLIO, S *et al.* Protein kinase A as a biological target in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, v. 13, p. 83–92, 2009.
- NEZHAT, Farr R *et al.* Expert Reviews. n. September, p. 262–267, 2015.
- NIDHYANANDAN, Saranya; BOREDDY, Thippeswamy S; CHANDRASEKHAR, Kothapalli B. Phosphodiesterase inhibitor , pentoxifylline enhances anticancer activity of histone deacetylase inhibitor , MS-275 in human breast cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, v. 764, p. 508–519, 2015.
- NIKOLETOPOULOU, V. *et al.* Crosstalk Between Apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1833, p. 3448–3459, 2013.
- NILSSON, MB; LANGLEY, RR; FIDLER, I.J. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokin. *Cancer Res*, v. 23, p. 10794–10800, 2005.
- NIWA, H; MIYAZAKI, J; SMITH, AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, v. 24, p. 372–6., 2002.
- NONAKA, M *et al.* Activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway overcomes cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer*, v. 22, n. 6, p. 922–9, 2012.
- O'BRIEN, CA *et al.* A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, v. 445, p. 106–110., 2007.
- OMURA, G *et al.* A randomized trial of cyclophosphamide and doxorubicin with or without cisplatin in advanced ovarian carcinoma. *Cancer*, v. 57, p. 1725–30, 1986.
- ORR, George A *et al.* Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*, v. 22, n. 47, p. 7280–7295, 2003.
- PAES, Marcela F *et al.* A retrospective analysis of clinicopathological and prognostic characteristics of ovarian tumors in the State of Espírito Santo, Brazil. *Journal of ovarian research*, v. 4, n. 1, p. 14, 2011.
- PAGE, C; LIN, HJ; JIN, Y; AL, Et. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res*, v. 20, p. 407–16, 2000.
- PAGE, C; LIN, HJ; JIN, Y; CASTLE, VP; *et al.* Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res*, v. 20, p. 407–416, 2000.
- PAL, Ipsita *et al.* Blockade of autophagy enhances proapoptotic potential of BI-69A11, a novel Akt inhibitor, in colon carcinoma. *European Journal of Pharmacology*, v. 765, p. 217–227, 2015.
- PAWLOWSKI, J. Bax-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 2, p. 529–531, 2000.
- PEREZ-GONZALEZ, R. PASCUAL, C. *et al.* Phosphodiesterase 7 inhibitor reduced cognitive impairment and pathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, v. 34, p. 2133–2145, 2013.
- PETRULEA, MS *et al.* PI3K/Akt/mTOR: A promising therapeutic target for non-medullary thyroid carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, v. 41, n. 8, p. 707–13, 2015.
- PIEK, JMJ *et al.* Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovariancancer. *Journal of Pathology*, v. 95, p. 451–456, 2001.
- POHL, G *et al.* Inactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway as a potential target-based therapy in ovarian serous tumors with KRAS or BRAF

- mutations. *Cancer Res*, v. 65, n. 5, p. 1994–2000, 2005.
- POLLARD, T.D.; BORISY, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, v. 112, p. 453–465, 2003.
- POWERS, Ginny L *et al.* Phosphodiesterase 4D inhibitors limit prostate cancer growth potential. *Molecular cancer research : MCR*, v. 13, n. 1, p. 149–160, 2015.
- PRAT, Jaime. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 124, n. 1, p. 1–5, 2014.
- QU, X *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, v. 112, p. 1809–20, 2003.
- QUINTANA, E *et al.* Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*, v. 18, p. 510–23, 2010.
- RANGEL, LB *et al.* Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene*, v. 22, n. 46, p. 7225–32, 16 out. 2003.
- RANGEL, Leticia B A *et al.* Tight Junction Proteins Claudin-3 and Claudin-4 Are Frequently Overexpressed in Ovarian Cancer but Not in Ovarian Cystadenomas
Tight Junction Proteins Claudin-3 and Claudin-4 Are Frequently Overexpressed in Ovarian Cancer but Not in Ovarian Cystadenomas. p. 2567–2575, 2003.
- RESHKIN, Stephan J *et al.* Paclitaxel Induces Apoptosis via Protein Kinase A- and p38 Mitogen-activated Protein-dependent Inhibition of the Na⁺ / H⁺ Exchanger (NHE) NHE Isoform 1 in Human Breast Cancer Cells 1. *Clinical Cancer Research*, v. 9, n. June, p. 2366–2373, 2003.
- RISS, TL *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*. [S.l.: s.n.], 2013. .
- ROSE-JOHN, Stefan. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, v. 8, n. 9, p. 1237–1247, 2012.
- ROSEN, DG *et al.* NIH Public Access. *Ratio*, v. 36, n. 3, p. 490–499, 2010.
- RUBIN, SC *et al.* Ten-year follow- up of ovarian cancer patients after second-look laparotomy with negative findings. *Obstet Gynecol*, v. 93, p. 21–24, 1999.
- SAKHARE, Shruti S *et al.* Transcriptome profile of OVCAR3 cisplatin-resistant ovarian cancer cell line. *BMC Bioinformatics*, v. 15, n. Suppl 10, p. P21, 2014.
- SALEHI, F *et al.* Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, v. 11, p. 301–321, 2008.
- SAMARDZIJA, C *et al.* A critical role of Oct4A in mediating metastasis and disease-free survival in a mouse model of ovarian cancer. *Mol Cancer*, v. 14, p. 152, 2015.
- SANTER, FR *et al.* . Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr-relat cancer*, v. 17, p. 241:53, 2010.
- SANTIAGO, I N G; NOVOA, A Chau. *Estimativa 2016 Incidência de Câncer no Brasil*. [S.l.: s.n.], 2016.
- SANTILLAN, A *et al.* Differences of chemoresistance assay between invasive micropapillary/low-grade serous ovarian carcinoma and high-grade serous ovarian carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, v. 17, n. 3, p. 601–606, 2007.
- SARBASSOV, D.D *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.
- SARFATI, Marika *et al.* Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase

- inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, v. 101, n. 1, p. 265–269, 2003.
- SARKAR, S. *et al.* Cancer development, progression and therapy: An epigenetic overview. *Int. J. Mol. Sci*, v. 14, p. 21087–21113, 2013.
- SATOH, J; ROMERO, MF. Mg²⁺ transport in the kidney. *Biometals*, v. 15, n. 3, p. 285–295, 2002.
- SAVAI, R *et al.* Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs*, v. 19, p. 117–131, 2010.
- SCHAUER, Isaiah Gregory *et al.* Interleukin-1 β promotes ovarian tumorigenesis through a p53/NF- κ B-mediated inflammatory response in stromal fibroblasts. *Neoplasia*, v. 15, n. 4, p. 409–20, 2013.
- SCHLESINGER, Paul H. *et al.* Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Pnas*, v. 94, n. October, p. 11357–11362, 1997.
- SEYMOUR, JF *et al.* Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, v. 13, p. 575–582, 1995.
- SHAYESTEH, L *et al.* PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genetics*, v. 21, p. 99–102, 1999.
- SHIH, Ie-Ming; KURMAN, R. J. A proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *Ovarian Tumorigenesis*, v. 164, n. 5, p. 1511–1518, 2004.
- SIGALOV, A.B. A novel ligand-independent peptide inhibitor of TREM-1 suppresses tumor growth in human lung cancer xenografts and prolongs survival of mice with lipopolysaccharide-induced septic shock. *Int Immunopharmacol*, v. 21, n. 1, p. 208–219, 2014.
- SINGER, G *et al.* Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol*, v. 29, n. 2, p. 218–24, 2005.
- SINGH, Amar B; SHARMA, Ashok; DHAWAN, Punita. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *Journal of oncology*, v. 2010, p. 541957, jan. 2010.
- SMALLEY, KSM. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International Journal of Cancer*, v. 104, n. 5, p. 527–532, 2003.
- SMITH, PG *et al.* The phosphodiesterase PDE4B limits cAMP-associated PI3K/AKT-dependent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *blood*, v. 105, n. 1, p. 308–316, 2005.
- SMITH, SJ *et al.* Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8⁺ T-lymphocytes. *Molecular pharmacology*, v. 66, n. 6, p. 1679–1689, 2004.
- SOLER, A. P. *et al.* Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells. *American Journal of Physiology*, v. 270, p. F869–F879, 1996.
- SOMMER, Ulrike *et al.* Mechanisms of SOCS3 phosphorylation upon interleukin-6 stimulation: Contributions of Src- and receptor-tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 36, p. 31478–31488, 2005.
- SON, Kyonghee K.; ROSENBLATT, Joe. Overexpression of protein kinase A - RI?? reduces lipofection efficiency of cisplatin-resistant human tumor cells. *Cancer Letters*, v. 165, n. 1, p. 81–86, 2001.
- SONOKI, Hiroyuki *et al.* Quercetin decreases claudin-2 expression mediated by up-

- regulation of microRNA miR-16 in lung adenocarcinoma A549 cells. *Nutrients*, v. 7, n. 6, p. 4578–4592, 2015.
- SOSLOW, Robert a. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, v. 27, n. 2, p. 161–74, abr. 2008.
- SRIVASTAVA, R K *et al.* Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Molecular and cellular biology*, v. 18, n. 6, p. 3509–3517, 1998.
- STACEY RICCI, M; ZONG, W. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *Oncologist*, v. 11, n. 4, p. 342–357, 2006.
- STADLMANN, S. *et al.* Ovarian carcinoma cells and IL-1 β -activated human peritoneal mesothelial cells are possible sources of vascular endothelial growth factor in inflammatory and malignant peritoneal effusions. *Gynecologic Oncology*, v. 97, n. 3, p. 784–789, 2005.
- STETLER-STEVENSON, WG; AZNAVOORIAN, S; LIOTTA, LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol*, v. 9, p. 541–73, 1993.
- STORDAL, Britta *et al.* BRCA1/2 mutation analysis in 41 ovarian cell lines reveals only one functionally deleterious BRCA1 mutation. *Molecular Oncology*, v. 7, n. 3, p. 567–579, 2013.
- SUCHI, K *et al.* Overexpression of Interleukin-6 suppresses cisplatin-induced cytotoxicity in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res*, v. 31, p. 67–75., 2011.
- SUNTERS, A *et al.* Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res*, v. 66, p. 212–20, 2006.
- SYED, V. *et al.* Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *J. Natl Cancer Inst.*, v. 94, p. 617–629, 2002.
- TAGA, T *et al.* Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer. *Cell*, v. 58, p. 573–81, 1989.
- TAKAHASHI, K; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, p. 663–76, 2006.
- TANWAR, PS *et al.* Mammalian target of rapamycin is a therapeutic target for murine ovarian endometrioid adenocarcinomas with dysregulated Wnt/ β -catenin and PTEN. *PLoS One*, v. 6, n. 6, p. e20715, 2011.
- THEURKAUF, W.E.; VALLEE, R.B. Extensive cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem*, v. 258, p. 7883–7886, 1983.
- THIERY, J. P. *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, p. 871–890, 2009.
- THIGPEN, JT *et al.* Phase II trial of paclitaxel in patients with progressive ovarian carcinoma after platinum-based chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, v. 12, p. 1748–53, 1994.
- TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today*, v. 18, n. 9, p. 428–432, 1997.
- TRIMBLE, EL *et al.* Paclitaxel for platinumrefractory ovarian cancer: results from the first 1,000 patients registered to National Cancer Institute Treatment Referral Center 9103. *J Clin Oncol*, v. 11, p. 2405–10, 1993.

- TSAI, Lo Lin *et al.* Oct4 mediates tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.
- TSUNODA, T *et al.* Inhibition of phosphodiesterase-4 (PDE4) activity triggers luminal apoptosis and AKT dephosphorylation in a 3-D colonic-crypt model. *Mol Cancer*, 2012.
- TURKE, AB *et al.* MEK Inhibition Leads to PI3K/AKT Activation by Relieving a Negative Feedback on ERBB Receptors. *Cancer Res*, v. 72, p. 3228, 2012.
- TURKSEN, Kursad; TROY, Tammy-Claire. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1816, n. 1, p. 73–9, ago. 2011.
- TURLEY, EA *et al.* Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol*, v. 5, p. 280–290, 2008.
- TWILLIE, DA *et al.* Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology*, v. 45, p. 542–549, 1995.
- VALENTE, Guido *et al.* Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.
- VAN DER ZEE, A. G. J. *et al.* Higher levels of interleukin-6 in cystic fluids from patients with malignant versus benign ovarian tumors correlate with decreased hemoglobin levels and increased platelet counts. *Cancer*, v. 75, n. 4, p. 1004–1009, 1995.
- VANDEN BERGHE, Tom *et al.* Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not. *Cellular Signalling*, v. 18, n. 3, p. 328–335, 2006.
- VAUGHAN, Sebastian *et al.* Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature reviews. Cancer*, v. 11, n. 10, p. 719–25, out. 2011.
- VISSER, K.E. De; JONKERS, J. Towards understanding the role of cancer-associated inflammation in chemoresistance. *Curr. Pharm. Des*, v. 15, n. 16, p. 1844–1853., 2009.
- VORONOV, E. *et al.* Unique Versus Redundant Functions of IL-1alpha and IL-1beta in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol*, v. 4, p. 177, 2013.
- WANG, Y *et al.* Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells. *Cytokine*, v. 59, p. 228–236, 2012.
- WANG, Y *et al.* Regulatory effect of E2, IL- 6 and IL- 8 on the growth of epithelial ovarian cancer cells. *Cell Mol Immunol*, v. 2, p. 365- 372, 2005.
- WANG, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Letters*, v. 295, n. 1, p. 110–123, 2010.
- WANG, Yue *et al.* Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. *Cytokine*, v. 59, n. 1, p. 145–155, 2012.
- WATANABE, Takafumi *et al.* Production of IL1-beta by ovarian cancer cells induces mesothelial cell beta1-integrin expression facilitating peritoneal dissemination. *Journal of Ovarian Research*, v. 5, n. 1, p. 7, 2012.
- WEI, Z *et al.* Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells*, v. 27, p. 2969–78, 2009.
- WEINSTEIN, RS; MERK, FB; ALROY, J. The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv Cancer Res*, v. 23, p. 23–89, 1976.
- WILLIAMS, LL. Secondary cytoreduction of ovarian malignancies. *Cancer of the ovary*. [S.l: s.n.], 1993. p. 187–203.

- WOLTER, K. G. *et al.* Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.*, v. 139, n. 5, p. 1281–1292, 1997.
- XU, Shili *et al.* Discovery of a Novel Orally Active Small-Molecule gp130 Inhibitor for the Treatment of Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 12, p. 937–949, 2013.
- YAMAMOTO, Noriko *et al.* The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. *International journal of oncology*, v. 47, n. 1, p. 325–334, 2015.
- YANG, Z. J. *et al.* The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, n. 9, p. 1533–1541, 2011.
- YI, SY *et al.* Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev*, v. 39, p. 290–6, 2013.
- YIN, X *et al.* Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. *J Hematol Oncol*, v. 8, p. 23, 2015.
- YOON, Chang Hwan *et al.* Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase C α (PKC α) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 1, p. 226–233, 2010.
- YOSHIDA, Y *et al.* Theophylline and cisplatin synergize in down regulation of BCL-2 induction of apoptosis in human granulosa cells transformed by a mutated p53 (p53 val135) and Ha-ras oncogene. *Int J Oncol*, v. 17, p. 227–35, 2000.
- YUAN, ZQ *et al.* Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene*, v. 19, p. 2324–2330, 2000.
- ZAINO, R. J. *et al.* Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, v. 117, p. 554–562, 2011.
- ZHA, H; REED, J. Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 272, n. 50, p. 31482–31488, 1997.
- ZHOU, Z *et al.* Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus. *J Biol Chem.*, v. 279, p. 27320–27326, 2004.

APÊNDICE A

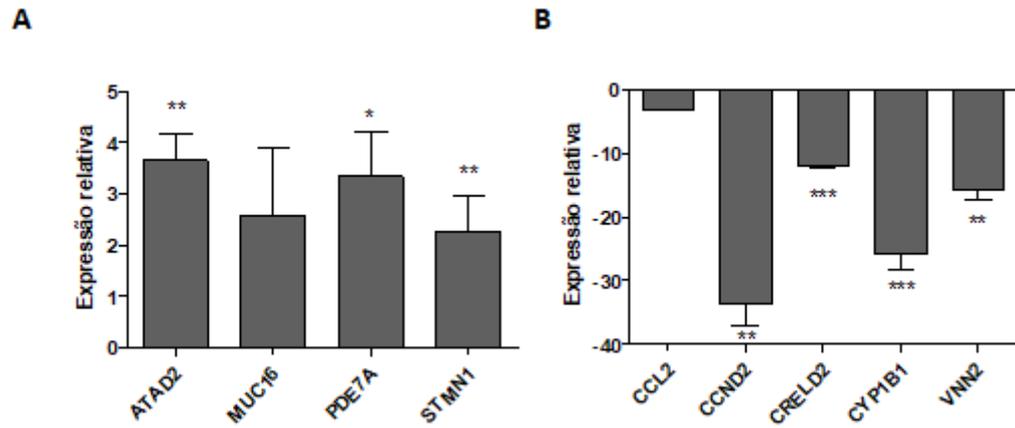


Figura 53: Os níveis de expressão relativa dos genes obtidos na análise do RNA seq nas amostras de tuba de Falópio e carcinoma seroso de alto grau foram validados por qPCR. Em (A) estão representados os genes de maior expressão e em (B) os genes menos expressos nas amostras de carcinoma seroso de alto grau em relação às amostras de tubo de falópio. Os dados foram normalizados usando GAPDH. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico (MannWhitney) em Graph Pad Prisma 5.0. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,001$ a $0,05$.