

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE OVÁRIO: 1) PAPEL DE NAC1 E BCL6 NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA; 2) EFEITO DA CISPLATINA NO FENÓTIPO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MIGRAÇÃO E QUIMIORRESISTÊNCIA.

ALICE LASCHUK HERLINGER

VITÓRIA – ES

2015

ALICE LASCHUK HERLINGER

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE OVÁRIO: 1) PAPEL DE NAC1 E BCL6 NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA; 2) EFEITO DA CISPLATINA NO FENÓTIPO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MIGRAÇÃO E QUIMIORRESISTÊNCIA.

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: Leticia Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA – ES

2015

Aos meus dois amores, Ronaldo e Ivan.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Ronaldo, pelo apoio e por todas as vezes em que se empolgou junto comigo com cada resultado e conquista.

Ao meu filho, Ivan, meu projetinho mais bem sucedido, que me mostrou como sou forte e capaz.

Aos meus pais, Erica e Anatólio, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de pessoas e profissionais que eles são.

A minha orientadora, Leticia Rangel, por me receber em seu laboratório e sempre confiar no meu trabalho.

Aos membros do LBCMCH, especialmente aos meus ICs, Roger, Laura e Kris, cujo auxílio, principalmente depois da chegada do Ivan, foi fundamental para concluir este trabalho.

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

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

Ao Dr. Celso Caruso-Neves por me receber no Laboratório de Bioquímica e Sinalização Celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À Dra. Melissa Medeiros Markoski por me receber no Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul.

À Dra. Mariana C. de Souza, do Laboratório de Farmacologia Aplicada da Fundação Oswaldo Cruz, pelos experimentos de dosagem de citocinas.

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

À Dra. Rita Gomes Wanderley Pires, do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental da Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues e à Dra. Naira Elane M. de Oliveira Nunes, do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo uso do termociclador.

À aluna Marcella Porto da Universidade Federal do Espírito Santo pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo.

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

“As pessoas que resolviam as coisas em geral tinham muita persistência e um pouco de sorte. Se a gente persistisse o bastante, a sorte em geral chegava.”

Charles Bukowski

RESUMO

O câncer de ovário (CAOV) é a neoplasia ginecológica mais letal, sendo que a disseminação da doença e a quimiorresistência podem ser considerados fatores determinantes no prognóstico da doença. O entendimento dos mecanismos envolvidos nesses processos é essencial ao aprimoramento da terapêutica do CAOV, sendo assim o alvo de estudo deste trabalho. Primeiramente, investigou-se o papel de NAC1 e BCL6 na regulação da transcrição no CAOV, utilizando-se como modelo *FOXQ1*. Viu-se que NAC1 e BCL6 interagem através do domínio BEN C-terminal de NAC1, formando um complexo que se liga a motivos de ligação a BCL6 localizados na região promotora de *FOXQ1* que, conforme se mostrou, possui três desses motivos. Em seguida, mostrou-se que existe uma correlação positiva entre a expressão de NAC1 e BCL6 em linhagens celulares de CAOV e em tumores. Mostrou-se ainda, que NAC1 liga-se ao promotor de *BCL6* de forma dependente da proteína BCL6, ativando a sua transcrição. Dessa forma, descreveu-se de forma inédita um mecanismo através do qual um membro da família BTB/POZ interage com BCL6 atenuando a sua autorregulação negativa. Por fim, através de análise de microarranjo de cDNA identificaram-se possíveis novos alvos de regulação do complexo NAC1/BCL6. Na segunda parte deste trabalho, analisaram-se os efeitos da cisplatina na progressão do CAOV. Mostrou-se que, em resposta ao tratamento por cinco dias com cisplatina 10^{-5} M, células da linhagem A2780 apresentaram aumento de migração, resistência e expressão do fenótipo de células-tronco tumorais CD44+CD24-; além da droga induzir uma parada do ciclo celular em fase G2/M. Também se analisou a secreção de TGF- β 1 e CXCL2, citocinas envolvidas com a resistência e metástase no câncer, em resposta à cisplatina, à doxorrubicina e ao paclitaxel, em três linhagens de CAOV derivadas de tumores dos tipos seroso

(A2780), endometrióide (MDAH-2774) e de células claras (TOV21G). Mostrou-se que, em resposta à cisplatina, apenas, havia o aumento da secreção de TGF- β 1 por células TOV21G e de CXCL2 por células A2780 e TOV21G. Em seguida, buscou-se identificar se CXCL2 exógeno seria capaz de induzir a resistência nas células A2780. Esse efeito não foi observado. Contudo, pode ser explicado pela regulação positiva da expressão de *CXCR2* induzida pela cisplatina aqui mostrada. Dessa forma, identificaram-se diferentes mecanismos que podem contribuir para a progressão do CAOV.

Palavras-chave: câncer de ovário, quimiorresistência, NAC1, BCL6, TGF- β 1, CXCL2, CXCR2.

ABSTRACT

Ovarian cancer (OVCA) is the most lethal gynecological cancer, and its dissemination and chemoresistance are major factors determining disease prognosis. Better understanding of mechanisms involved in these processes is crucial to improve OVCA therapy; therefore being the aim of the present study. Firstly, the role of NAC1 and BCL6 regulating transcription in OVCA has been investigated using *FOXQ1* as a study model. It has been shown that NAC1 and BCL6 interact through NAC1's BEN C-terminus domain, forming a complex which binds to three BCL6 binding motives on *FOXQ1* promoter, activating its transcription. A positive correlation between NAC1 and BCL6 expression has been shown in OVCA cell lines and tumor specimens. Moreover, BCL6-dependending NAC1 binding to *BCL6* promoter activating its transcription has been shown. Therefore, a novel mechanism by which a BTB/POZ family member interacts with BCL6 attenuating its auto-repression has been herein described. Finally, cDNA microarray analyzes revealed a plethora of putative NAC1/BCL6 target genes. On the second chapter, the effects of cisplatin on OVCA progression have been analyzed. It has been shown that a five-day treatment with 10^{-5} M cisplatin of A2780 cell increased chemoresistance, cell migration and expression of the cancer-stem cell associated phenotype CD44+CD24-, and a G2/M cell cycle arrest. The secretion of TGF- β 1 and CXCL2, both cytokines involved in migration and resistance in cancer, in response to cisplatin, doxorubicin, and paclitaxel, by three cell lines originated from serous (A2780), endometrioid (MDAH-2774), and clear cell (TOV21G) OVCA subtypes has been measured. In response to cisplatin, TGF- β 1 secretion by TOV21G cells has increased, as has CXCL2 secretion by TOV21G and A2780. When analyzing the effect of exogenous CXCL2 in drug resistance, this relation could not be

demonstrated. However, it could be explained by *CXCR2* overexpression in response to cisplatin, which has been herein demonstrated. Therefore, several different mechanisms leading to OVCA progression have been identified.

Key words: ovarian cancer, chemoresistance, NAC1, BCL6, TGF- β 1, CXCL2, CXCR2

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG2	proteína transportadora membranar cassete de ligação a ATP, sub-família G, membro 2
ACS	<i>American Cancer Society</i>
ACTB	gene que codifica a actina beta
APP	gene da proteína precursora amiloide
ARID1A	gene da proteína que contém o domínio interativo rico em AT 1A, atua na remodelação de cromatina
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BCL6	proteína 6 de linfoma de células B, codificado pelo gene <i>BCL6</i>
BEN	domínio de interação proteína-proteína e proteína-DNA
BRCA1	gene supressor tumoral <i>breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	gene supressor tumoral <i>breast cancer 2, early onset</i>
BTB/POZ	<i>brick-a-brac tramtrack-broad/pox virus and zinc finger</i> , domínio proteico presente nas proteínas pertencentes à família homônima
C186	forma truncada de NAC1 correspondente ao domínio BEM C-terminal de NAC1, necessário para sua interação com BCL6
CA125	antígeno carboidrato 125
CAOV	câncer de ovário
CD24	<i>cluster</i> de diferenciação 24, glicoproteína de superfície celular

CD44	<i>cluster</i> de diferenciação 44, glicoproteína de superfície celular
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CFB	gene que codifica o fator B do complemento
Ch-IP	imunoprecipitação de cromatina
CISP	cisplatina
CLDN1	gene da claudina 1
Co-IP	co-imunoprecipitação
CSC	células-tronco tumorais, do inglês, <i>cancer stem cells</i>
CtBP	proteína <i>C-terminal binding protein</i> , membro da família BTB/POZ
CTNNB1	gene catenina (proteína associada à caderina) 1 beta
CXCL1	quimiocina (C-X-C) ligante 1
CXCL2	quimiocina (C-X-C) ligante 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOXO	doxorrubicina
DTBP	peróxido di-tert-butílico
EMT	transição epitélio mesenquimal, do inglês <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, também dá nome à classificação do câncer proposta por esta

FOXQ1	gene <i>forkhead box Q1</i> , codifica um fator de transcrição identificado como alvo direto da regulação de NAC1
Gadd45GIP1	proteína 1 que interage com a proteína induzida por parada de crescimento e dano ao DNA
GAPDH	gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HDAC3	enzima histona desacetilase 3
HDAC4	enzima histona desacetilase 4
HGSC	carcinoma seroso de alto grau, do inglês <i>high grade serous carcinoma</i>
HMGB	gene <i>high mobility box 1</i>
IGFBP5	gene da proteína 5 que se liga ao fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	imunoglobulina G
IL17	interleucina 17
IL6	interleucina 6
IL8	interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP6K3	gene da <i>inositol hexakisphosphate kinase 3</i>
JHU	<i>Johns Hopkins University</i>

KRAS	oncogene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato v-Ki-ras2 Kirsten
MMP2	enzima matriz metaloproteinase 2
MMP3	enzima matriz metaloproteinase 3
MTT	brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
N130	forma truncada de NAC1 correspondente ao domínio BTB/POZ N-terminal da proteína, promove a inativação de NAC1 por impedir sua homo-oligomerização
NAC1	proteína associada ao núcleo acumbente 1, codificado pelo gene <i>NACC1</i>
NACC1	gene que codifica a proteína associada ao núcleo acumbente 1 (NAC1)
NANOG	gene nanog homeobox, que codifica o fator de transcrição nanog
NES	gene que codifica a proteína de citoesqueleto nestina
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NT	não tratado
Oct-4	fator de transcrição 4 que se liga a octâmero, fator de transcrição envolvido com auto-renovação e manutenção de fenótipo indiferenciado
OVCA	<i>ovarian cancer</i>
PACLI	paclitaxel

PATZ	proteína <i>POZ-, AT-hook, and zinc finger-containing protein</i> , membro da família BTB/POZ
PBS	tampão fosfato salina
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinase
PIK3CA	gene da subunidade catalítica alfa da fosfatidilinosito-3-cinase
POU5F	gene fator de transcrição 1, classe 5, que contém domínio POU, codifica Oct-4
PROM1	gene prominina 1, codifica a glicoproteína CD133
PTEN	gene que codifica a fosfatase homóloga à tensina
PTGS2	gene da prostaglandina endoperóxido sintase 2, ou ciclooxigenase 2
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
SDHD	gene da subunidade D do complexo succinato desidrogenase
SFB	soro fetal bovino
SHMT1	gene da serina hidroximetiltranserase 1 (solúvel)
siBCL6	siRNA específico para <i>BCL6</i>
siCTRL	siRNA controle negativo
siNAC1	siRNA específico para <i>NACC1</i>
siRNA	RNA de interferência, do inglês <i>small interfering RNA</i>

SNAI1	gene dedo de zinco 1 da família snail, codifica o fator de transcrição Snail1, envolvido em transição epitélio-mesenquimal
SNAI2	gene dedo de zinco 2 da família snail, codifica o fator de transcrição Snail1, envolvido em transição epitélio-mesenquimal
SOD2	superóxido desmutase 2
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TP53	gene supressor tumoral proteína tumoral p53
TWIST1	gene fator de transcrição 1 da família twist bHLH, codifica o fator de transcrição Twist1, envolvido com metástase
VCM	viabilidade celular metabólica
Zeb1	fator de transcrição <i>zinc finger E-box-binding homolog 1</i>
ZF	domínio dedo de zinco de interação com DNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos tumores ovarianos de acordo com o tipo celular de origem.....	31
Figura 2 - Classificação dos tumores ovarianos.....	33
Figura 3 - Representação dos diferentes sítios de origem do CAOV, conforme modelo proposto por VAUGHAN e colaboradores em 2011..	36
Figura 4 - Evolução da quimioterapia do CAOV de 1985 a 2002.....	38
Figura 5 – Incidência e mortalidade do CAOV nos Estados Unidos de 1975 a 2011.	41
Figura 6 - Mecanismos celulares tumorais associados à resistência à quimioterapia..	43
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura de NAC1.....	46
Figura 8 - O promotor de <i>FOXQ1</i> possui três motivos de ligação a BCL6.....	65
Figura 9 - Análise da interação entre NAC1 e BCL6 por Co-IP.....	66
Figura 10 - BCL6 ativa a transcrição de <i>FOXQ1</i> de forma dependente de NAC1..	67
Figura 11 - Coexpressão de NAC1 e BCL6 no CAOV..	69
Figura 12 - NAC1 modula a expressão de BCL6.	72
Figura 13 - Eficiência de transfecção relativa aos dados da Figura 12..	73
Figura 14 - Ligação de NAC1 ao promotor de <i>BCL6</i> é necessária para prevenir sua autorregulação negativa.....	74
Figura 15 - Identificação de novos alvos regulatórios do complexo NAC1/BCL6.....	75
Figura 16 - Modelos propostos para o papel de NAC1 na regulação da expressão gênica.....	79
Figura 17 - Origem das CSC.....	84
Figura 18 - Efeito dual de TGF- β no câncer.....	87

Figura 19 - O papel de quimiocinas CXC e seus receptores no ambiente tumoral..	88
Figura 20 - Efeito da cisplatina na migração celular.....	98
Figura 21 - Efeito da cisplatina na indução da resistência.	101
Figura 22 - Efeito da cisplatina na formação de colônias.....	101
Figura 23 - Efeito da cisplatina no ciclo celular.	102
Figura 24 - Cisplatina induz o fenótipo CD44+CD24-..	103
Figura 25 - Efeito do tratamento com quimioterápicos na secreção de TGF- β 1 por células de CAOV.....	109
Figura 26 - Efeito do tratamento com quimioterápicos na secreção de CXCL2 por células de CAOV.....	113
Figura 27 - Efeito de CXCL2 recombinante na resistência à cisplatina.....	114
Figura 28 - Efeito da cisplatina na expressão de <i>CXCR2</i>	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências <i>primers</i> utilizados nos ensaios de qPCR.	55
Tabela 2 - Dez primeiras categorias funcionais de acordo com o $-\log(p \text{ valor})$ da análise IPA reguladas positivamente por NAC1 e BCL6.	76
Tabela 3 - Dez primeiras categorias funcionais de acordo com o $-\log(p \text{ valor})$ da análise IPA reguladas negativamente por NAC1 e BCL6.	77
Tabela 4 - Concentrações finais dos quimioterápicos utilizadas para determinação dos valores de IC50.	91
Tabela 5 - Anticorpos e controles positivos utilizados nos ensaios de ELISA para dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura.	93
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados nos ensaios de qPCR	94
Tabela 7 - Valores de IC50 de cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel calculados e utilizados para as linhagens A2780, MDAH-2774 e TOV-21G.	96
Tabela 8 - Número e viabilidade das células A2780, MDAH-2774 e TOV21G após três e cinco dias de cultivo na condição não tratada, ou tratada com cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel nas concentrações descritas na Tabela 7.	107

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS	19
SUMÁRIO	20
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1. CÂNCER DE OVÁRIO	28
2.2. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CAO V	28
2.3. CLASSIFICAÇÃO DO CAO V	30
2.4. PATOGÊNESE DO CAO V	32
2.5. DIAGNÓSTICO DO CAO V	34
2.6. TRATAMENTO DO CAO V	37
CAPÍTULO 1: PAPEL DE NAC1 E BCL6 NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.	44
3. INTRODUÇÃO	45
3.1. A FAMÍLIA BTB/POZ DE REGULADORES TRANSCRICIONAIS.....	45
3.1.1. A proteína associada ao núcleo acumbente-1	45
3.1.2. A proteína 6 de linfoma de células B	49

4.	OBJETIVO GERAL	51
4.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.1.	LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	52
5.2.	CAMUNDONGOS <i>KNOCK-OUT</i> PARA <i>NACC1</i>	52
5.3.	TRANSFECCÕES.....	53
5.4.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (QPCR).....	54
5.5.	ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>BCL6</i>	55
5.6.	IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA.....	56
5.7.	CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO	56
5.8.	IMUNOBLOT	57
5.9.	ENSAIO DE ATIVIDADE PROMOTORA PELO GENE REPÓRTER LUCIFERASE.....	58
5.10.	IMUNOISTOQUÍMICA.....	58
5.11.	MICROARRANJO DE CDNA	59
5.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1.	<i>NAC1</i> E <i>BCL6</i> FORMAM UM COMPLEXO QUE MODULA A EXPRESSÃO DE GENES-ALVO	61
6.2.	<i>NAC1</i> E <i>BCL6</i> SÃO SUPEREXPRESSOS NO CAO V	64
6.3.	<i>NAC1</i> ATENUA A AUTORREGULAÇÃO NEGATIVA DE <i>BCL6</i>	68

6.4. IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS ALVOS REGULATÓRIOS DO COMPLEXO NAC1/BCL6	70
7. CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO 2: EFEITO DA CISPLATINA NO FENÓTIPO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MIGRAÇÃO E QUIMIORRESISTÊNCIA.	80
8. INTRODUÇÃO	81
9. OBJETIVO GERAL	89
9.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	89
10. MATERIAIS E MÉTODOS	90
10.1. LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	90
10.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE METABÓLICA CELULAR E CÁLCULO DE IC50.....	90
10.3. TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS.....	91
10.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	91
10.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA	92
10.6. CITOMETRIA DE FLUXO.....	92
10.7. DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE.....	93
10.8. TRATAMENTO COM CXCL2 RECOMBINANTE	93
10.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (QPCR).....	94
10.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	94
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
11.1. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IC50 DAS DROGAS	96

11.2. CISPLATINA INDUZ A MIGRAÇÃO E A RESISTÊNCIA EM CÉLULAS DE CAOV A2780.....	97
11.3. EFEITO DA CISPLATINA NO FENÓTIPO DE CSC DE CÉLULAS DE CAOV A2780	100
11.4. EFEITO DA CISPLATINA NA SECREÇÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS DE CAOV.....	105
11.5. EFEITO DE CXCL2 EXÓGENO NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA	111
12. CONCLUSÕES	116
13. CONCLUSÕES GERAIS.....	117
14. PERSPECTIVAS.....	119
REFERÊNCIAS	120
ANEXO I	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 2	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

O CAOV é o câncer ginecológico mais letal. Limitações no diagnóstico, devido, principalmente à ausência de sintomas característicos e de métodos diagnósticos precisos, fazem com que a maioria das pacientes seja diagnosticada quando a doença encontra-se em estadios avançados, onde essa já se encontra disseminada na cavidade peritoneal. Dessa forma, o diagnóstico geralmente ocorre durante cirurgia citorrredutora extensa, a qual já representa parte do tratamento do CAOV. Devido à disseminação do tumor no momento da cirurgia, há a dificuldade de remover a totalidade das células tumorais, o que leva a um pior prognóstico à doença. Concomitantemente, como parte do tratamento, temos a quimioterapia adjuvante, a qual é baseada, principalmente, em derivados de platina e taxanos. No entanto, essa é, na maioria das vezes, ineficaz, uma vez que a maioria das pacientes vai, num primeiro momento, apresentar boa resposta, mas acabará por apresentar recidiva da doença, associada à quimiorresistência. Dessa forma, a quimiorresistência e a capacidade das células tumorais de espalharem-se pela cavidade peritoneal são fatores importantíssimos para a progressão da doença e cujos mecanismos moleculares devem ser melhor entendidos a fim de prevenir tal progressão.

A quimiorresistência é um processo multifatorial onde diversos mecanismos permitem às células sobreviver à quimioterapia. Dentre esses podemos citar: a expressão de proteínas, como fatores de transcrição, levando à ativação de diversas vias que promovem a progressão tumoral; a presença de sub-populações celulares que respondem diferencialmente à terapia, como as células-tronco tumorais (CSC); e o papel do microambiente tumoral, o qual, através de fatores

liberados pelas células tumorais e/ou outras células que compõem esse ambiente, regula tanto a progressão maligna ao promover proliferação e migração, por exemplo, ou interferindo na imunidade antitumoral.

Nesse contexto, NAC1 possui um papel crucial na carcinogênese ovariana e na progressão da doença. Diversos estudos já demonstraram a sua implicação na proliferação, migração e quimiorresistência, dentre outros, de células de CAO. Sua expressão em tumores primários representa um marcador prognóstico negativo para a doença. Recentemente, também foi possível identificar uma série de genes cuja expressão é alterada frente ao silenciamento gênico de NAC1. Dentre esses, *FOXQ1* foi demonstrado como um alvo direto da regulação de NAC1, o qual é essencial e suficiente para a ativação de sua transcrição. No entanto, NAC1 não possui o domínio dedo de zinco de interação com o DNA classicamente encontrado nos membros de sua família proteica, BTB/POZ, fazendo com que dependa da interação com cofatores de transcrição para exercer sua função regulatória. Dessa forma, o mecanismo através do qual NAC1 promove sua função regulatória da transcrição gênica permanece desconhecida. A interação de NAC1 e BCL6, outro membro da família BTB/POZ, já foi descrita. Recentemente, BCL6 foi descrito como um marcador prognóstico negativo no CAO, e sua função de promoção da proliferação e migração de células de linhagens derivadas de CAO foi demonstrada. Sendo assim, devido à sobreposição de funções descritas para NAC1 e BCL6 no CAO, bem como pelo fato de a interação desses dois fatores já ter sido descrita anteriormente, questionou-se se NAC1 e BCL6 poderiam formar um complexo regulatório no CAO.

As CSC correspondem a uma sub-população da massa tumoral que possui características importantes para a iniciação, progressão e recidiva do tumor. Dentre

as características dessas células podemos citar a capacidade de auto-renovação, diferenciação, quimiorresistência, tumorigenicidade e migração, levando à metástase. As CSC também possuem um perfil diferencial de expressão de moléculas que permite a sua identificação e isolamento. Dentre esses, o perfil de expressão das moléculas de adesão CD44 e CD24 vem sendo utilizado para identificação dessas células em diferentes tipos de tumores.

Por fim, o microambiente no qual o tumor se desenvolve afeta diretamente a progressão da doença. Fatores secretados tanto pelas células tumorais quanto pelas demais células que formam esse microambiente, tais como células do sistema imune e células endoteliais, afetam diretamente o tumor promovendo a proliferação e migração de células tumorais, bem como atuam modulando a resposta imune anti-tumoral. Nesse contexto, TGF- β 1 e CXCL2 são fatores cujo efeito de modulação desses processos já foi descrito. O primeiro apresenta um papel dual no câncer, podendo tanto inibir a proliferação de células com baixo potencial maligno, quanto induzir um fenótipo migratório e metastático, tanto por mecanismos dependentes de transição epitélio-mesenquimal, podendo, assim, dar origem a CSC, quanto por mecanismos independentes dessa. Mecanismos de resistência à quimioterapia mediados por TGF- β 1 também já foram descritos. Ainda, TGF- β 1 pode atuar inibindo a ação de linfócitos T citotóxicos e inibindo, assim, a resposta imune antitumoral. Por outro lado, a expressão de CXCL2 por células de tumores de mama está relacionada à aquisição tanto de quimiorresistência quanto de fenótipo metastático pelas células. Além disso, a inibição de CXCR2, um dos receptores ativados por CXCL2, leva a aumento da resposta à terapia, diminuição da proliferação de células tumorais, angiogênese e metástase pulmonar, também no câncer de mama.

Dessa forma, com o objetivo geral de melhor entender os processos moleculares e celulares que levam à progressão do CAOV, dividiu-se o presente trabalho em dois capítulos: 1) Papel de NAC1 e BCL6 na regulação da expressão gênica; 2) Efeito da cisplatina no fenótipo de células-tronco tumorais, migração e quimiorresistência.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CÂNCER DE OVÁRIO

2.2. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CAO V

De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, em 2014, foram estimados 21.980 novos casos diagnosticados e 14.270 mortes em decorrência do CAO V nos Estados Unidos. No ano de 2011, a prevalência desse câncer foi de 188.867 no mesmo país (ACS, 2014). Considerando dados de 2007 a 2011, a incidência do CAO V foi de 12,3 por 100.000 mulheres anualmente e a mortalidade, 7,9 por 100.000 no mesmo período (NCI, 2014). Dessa forma, o CAO V não figura entre os 10 cânceres mais incidentes na população feminina, contudo é o 5º mais letal nessa população e o mais letal dentre os cânceres ginecológicos (NCI, 2014).

No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, foram estimados 5.680 novos casos de CAO V para o ano de 2014 e 3.027 mortes no mesmo período, com um risco estimado de 5,58 para cada 100.000 mulheres (INCA, 2014). Quando desconsideramos os tumores de pele do tipo não melanoma, o CAO V é o oitavo mais incidente na maioria das regiões brasileiras, com maior risco estimado verificado em estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (INCA, 2014). Em relação aos demais cânceres ginecológicos, no Brasil, o CAO V ocupa o segundo lugar em incidência, atrás apenas do câncer de colo uterino. No Espírito Santo, diferentemente dos demais estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, há incidência inferior à média nacional, com risco bruto estimado de 5,06 por 100.000 habitantes, o que corresponde a 90 novos casos diagnosticados nesse período. Não obstante, a ocorrência de casos familiares de

CAOV é rara, sendo que a doença é, majoritariamente, de caráter esporádico (HOLSCHNEIDER; BEREK, 2000).

Ainda há questionamento sobre os fatores de risco de desenvolvimento do CAOV. Dentre os fatores ambientais que levam ao aumento do risco de desenvolvimento de CAOV, podemos citar o envelhecimento, com 50% dos casos sendo diagnosticados em mulheres com mais de 63 anos (NCI, 2014). O índice de massa corporal também é um fator de risco para o desenvolvimento de CAOV em mulheres que não fizeram terapia de reposição hormonal pós-menopausal (EPIDEMIOLO, 2012). Ainda, fatores endócrinos e reprodutivos podem contribuir positiva ou negativamente para o risco de desenvolvimento do CAOV e, recentemente, foram revisados por Schüler e colaboradores (SCHÜLER et al., 2013). Dentre esses fatores, podemos citar menarca precoce e menopausa tardia, que, assim como a duração do ciclo menstrual (longo), aumentam o risco de desenvolvimento de CAOV. Por outro lado, lactação e paridade são fatores protetores sendo que, inclusive, mulheres com mais de cinco partos têm uma redução de 80% no risco de desenvolver CAOV. Ainda, tratamentos hormonais podem influenciar o risco cumulativo de desenvolvimento de CAOV: enquanto o uso de contraceptivos orais tem caráter protetor, a terapia de reposição hormonal pós-menopausal aumenta este risco.

Alterações genéticas específicas são responsáveis por aproximadamente 10% dos casos de CAOV. Mutações e deleções nos genes *BRCA1* e *BRCA2* já são sabidamente associadas com risco aumentado de desenvolvimento de CAOV; 20-65% em comparação a 5-13% na população que não tem as mutações (revisado por CHORNOKUR et al., 2013). Como será discutido posteriormente, atualmente está bem estabelecido que o CAOV é, na realidade, uma doença heterogênea que compreende tumores de diferentes tipos histológicos, com características clínicas e

moleculares igualmente distintas. Dessa forma, diferentes tipos histológicos possuem perfis de mutações gênicas característicos: mutações em *TP53* são mais comuns em carcinomas ovarianos serosos de alto grau (HGSC, do inglês *high grade serous carcinoma*) do que em qualquer outro tipo de tumor sólido (BOWTELL, 2010). Por outro lado, carcinomas de células claras apresentam altos graus de mutações que ativam a subunidade catalítica de PI3K, *PIK3CA*, enquanto que cerca de 50% dos tumores mucinosos apresentam mutações em *KRAS* e tumores endometrioides têm mutações em *CTNNB1* (que codifica beta-catenina), *PTEN* e *PIK3CA* (revisado por SHIH; DAVIDSON, 2009).

2.3. CLASSIFICAÇÃO DO CAO V

O CAO V é uma doença heterogênea que compreende diferentes tipos histológicos com características clinicopatológicas distintas. Inicialmente, podem-se dividir os tumores ovarianos de acordo com o tipo celular que originou o tumor. Sendo assim, os tumores podem ser: (i) epiteliais; (ii) de células germinativas e (iii) de células estromais (Figura 1). Tumores epiteliais originam-se das células que cobrem a superfície externa do ovário, ao passo que tumores de células germinativas derivam das células que originam oócitos e tumores estromais desenvolvem-se das células da camada estromal que confere a estrutura do ovário (ALGECIRAS-SCHIMNICH, 2013).

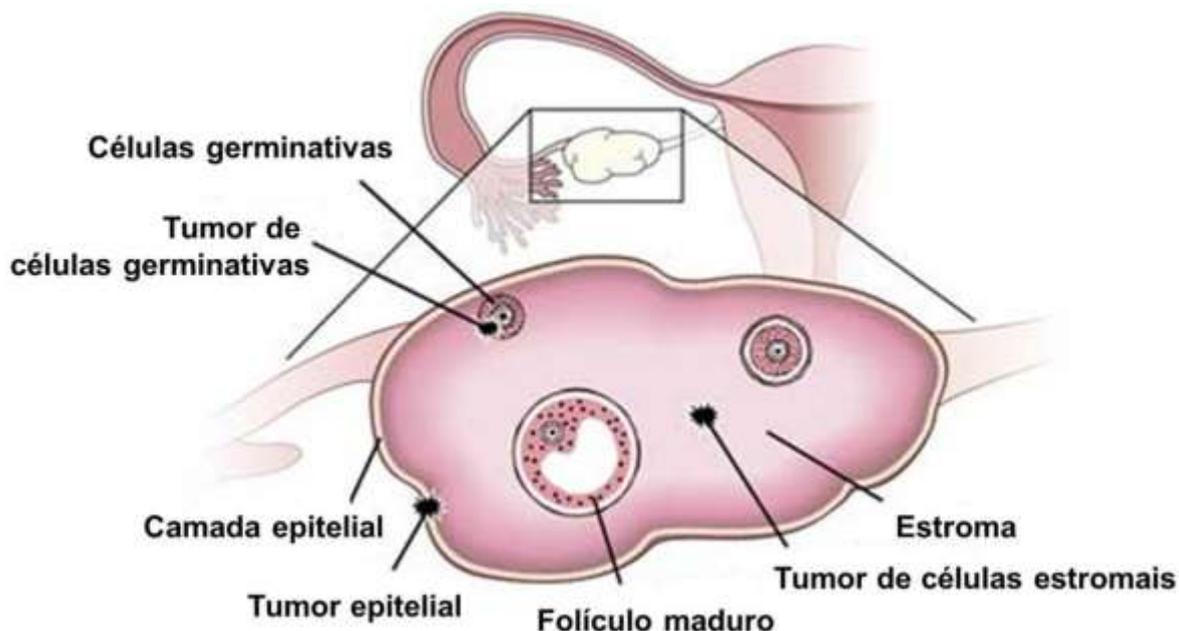


Figura 1 - Representação dos tumores ovarianos de acordo com o tipo celular de origem. Os tumores ovarianos podem ser classificados, inicialmente, conforme o tipo celular que os origina como epiteliais, quando originados de células do epitélio da superfície do ovário, de células germinativas e estromais, quando originados das respectivas células. Adaptado de ALGECIRAS-SCHIMNICH, 2013.

Os tumores epiteliais correspondem a aproximadamente 70% de todas as neoplasias ovarianas e a uma proporção ainda maior das neoplasias malignas (KAKU et al., 2003), sendo, portanto, o foco principal deste trabalho. Os tumores de origem epitelial ainda podem ser divididos, de acordo com o padrão predominante de diferenciação das células tumorais, em quatro subtipos histológicos, aqui listados em ordem decrescente de incidência: seroso, mucinoso, endometrióide e de células claras, cada qual podendo ser benigno, *borderline* (com baixo potencial maligno) e maligno (KAKU et al., 2003).

Outro modelo divide os tumores ovarianos epiteliais em dois grandes grupos: tumores tipo I e tumores tipo II de acordo com a sua diferenciação e forma pela qual se desenvolvem (revisados por JONES; DRAPKIN, 2013; SHIH; KURMAN, 2004) (Figura 2). Nessa classificação, o subtipo histológico do tumor não é,

necessariamente, parâmetro para sua classificação, bem como não o é o sítio de origem do tumor. Tumores do tipo I incluem tumores serosos e endometrioides de baixo grau, tumores mucinosos e um subgrupo de tumores de células claras, todos os quais se desenvolvendo de forma gradual desde precursores bem reconhecidos, na maioria das vezes, tumores *borderline*. Em comum, todos esses tumores têm a propriedade de desenvolver-se de forma lenta e confinados aos ovários. Além disso, tumores do tipo I são geneticamente estáveis, com cada subgrupo apresentando um perfil genético característico. Os tumores de tipo II, por sua vez, englobam os HGSC, carcinomas indiferenciados, tumores mesodermis mistos malignos (carcinossarcoma) e alguns tipos de carcinomas de células claras. Os HGSC são os mais comuns dentre os de tipo II; desenvolvem-se rapidamente, possuem mutações em *TP53*, e exibem muitas alterações no número de cópia de DNA.

2.4. PATOGÊNESE DO CAO V

Do ponto de vista histológico, devido à ausência de lesões primárias nos ovários e à heterogeneidade da doença, vem sendo proposto que o ovário não é o sítio inicial do câncer. Nesse contexto, conforme estudos genômicos e referentes à patologia da doença, o termo CAO V não descreve uma doença apenas, porém, um conjunto de doenças, que compartilham uma localização anatômica comum (VAUGHAN et al., 2011). Sendo assim, há, no ovário, o desenvolvimento de metástases de cânceres originados em outros órgãos (Figura 3).

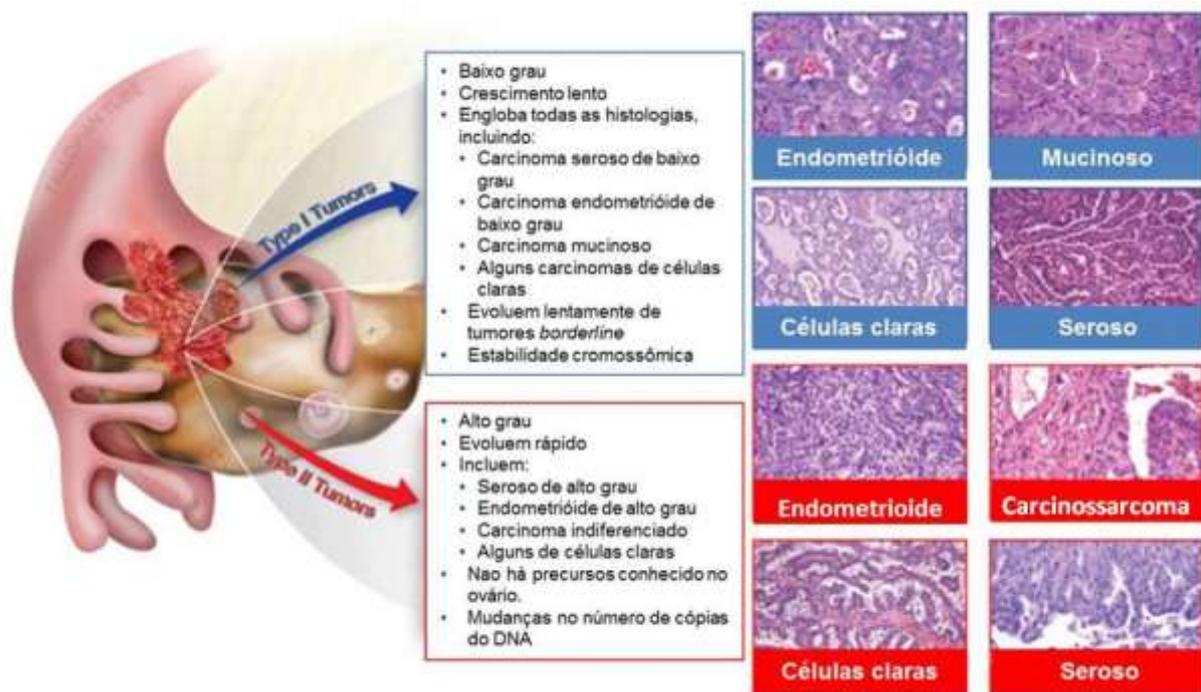


Figura 2 - Classificação dos tumores ovarianos. Tumores de tipo I (*type I tumors*) são de baixo grau e englobam carcinomas de crescimento lento que geralmente desenvolvem-se a partir de lesões primárias identificadas (tumores *borderline*), as quais desenvolvem-se do epitélio da superfície do ovário, incluindo cistos ou endometriose. Em contraste, tumores tipo II (*type II tumors*) são de alto grau e de crescimento rápido. Tipicamente, encontram-se disseminados para além do ovário no momento do diagnóstico. Adaptado de JONES & DRAPKIN, 2013.

Alguns estudos histológicos detalhados de CAOV mucinosos invasivos concluíram que esses são, na realidade, metástases de cânceres de órgãos do trato gastrointestinal, como cólon, apêndice e estômago (KELEMEN; KÖBEL, 2011; LEE et al., 2007; ZAINO et al., 2011). Por outro lado, estudos genômicos trouxeram evidências de que CAOV endometrióide e de células claras parecem ter origem no endométrio das pacientes. Nesses estudos, foi mostrado que tanto as células tumorais quanto aquelas das lesões endometrioides adjacentes contêm as mesmas mutações em genes como os da *PIK3CA* e da proteína de remodelamento de cromatina *ARID1A*, trazendo evidências da origem extraovariana desses tumores (JONES et al., 2010; KUO et al., 2009; WIEGAND et al., 2010). Os HGSC, por sua vez, podem originar-se das células epiteliais da superfície do ovário e/ou da porção distal das tubas uterinas, sendo que a contribuição relativa desses dois órgãos

ainda não é conhecida (VAUGHAN et al., 2011). Um estudo realizado em 2001 mostrou que a presença de hiperplasia e displasia nas tubas uterinas predispõe as mulheres ao desenvolvimento de CAO V (PIEK et al., 2001). Esse estudo mostrou, ainda, que a presença dessas alterações é acompanhada de desregulação de proteínas de ciclo celular, seguida de perda de *BRCA1* nas tubas uterinas; aberrações presentes na maioria das mulheres com CAO V hereditário. Posteriormente, um estudo visando identificar a porção da tuba uterina que origina o CAO V analisou a expressão de p53, marcadores de proliferação celular e marcadores de instabilidade cromossômica, tendo identificado a fímbria como o sítio candidato para a carcinogênese serosa e apontado essa estrutura como alvo para detecção precoce e prevenção de HGSC (LEE et al., 2007). Por fim, resultados de estudos, conduzidos *in vitro* com cultura primária de células de tubas uterinas e *in vivo* com camundongos, demonstraram a origem tubária do HGSC (KIM et al., 2012; LEVANON et al., 2010).

2.5. DIAGNÓSTICO DO CAO V

Devido à inexistência de sinais e sintomas patognomônicos da doença, bem como pela carência de métodos diagnósticos específicos para o CAO V, 75% das pacientes são diagnosticadas com doença avançada e metastática (OZOLS, 2006). Na maioria das vezes, a sintomatologia do CAO V confunde-se com sinais de condições benignas, sobretudo aqueles relacionados com o trato gastrointestinal (TAVASSOL; DEVILLE, 2003), como dor abdominal ou pélvica, dificuldade para alimentar-se ou rápida sensação de saciedade, emagrecimento, urgência ou alta frequência urinária, dentre outros. Na realidade, o sintoma mais marcante da doença é o alargamento abdominal causado pelo acúmulo de líquido, o que muitas

vezes reflete quadros de ascite que acompanham a progressão da doença em seus estadios mais avançados (NCI, 2014).

O diagnóstico do CAO, na maioria dos casos, dá-se somente após a cirurgia, pelo exame histopatológico (AEBI; CASTIGLIONE, 2008). Contudo, ultrassonografia transvaginal e dosagem dos níveis séricos do antígeno CA-125 são empregados a fim de reforçar a hipótese diagnóstica pré-operatória de CAO. Porém, cabe ressaltar que esses métodos são inespecíficos e de baixa reprodutibilidade. O CA-125, devido à ausência de outros marcadores mais específicos, é o biomarcador mais utilizado para auxiliar no diagnóstico de CAO. Contudo, apresenta como limitação o grande número de resultados falso-positivos, visto que se encontra em níveis elevados, tanto em outras doenças neoplásicas e não-neoplásicas, como adenocarcinoma de endométrio e de tuba uterina, endometriose, salpingooforite (inflamação simultânea das tubas uterinas e ovários), diverticulite, cirrose hepática e pancreatite; quanto em condições fisiológicas, como durante a menstruação e a gravidez (NOSSOV et al., 2008). Atualmente, na realidade, a dosagem dos níveis de CA-125 tem maior aplicabilidade no acompanhamento das pacientes durante o tratamento, uma vez que a variação dos seus níveis pode refletir, ainda que de modo não acurado, a refratariedade e a resistência à terapia empregada, ou mesmo recidiva da doença (AEBI; CASTIGLIONE, 2008).

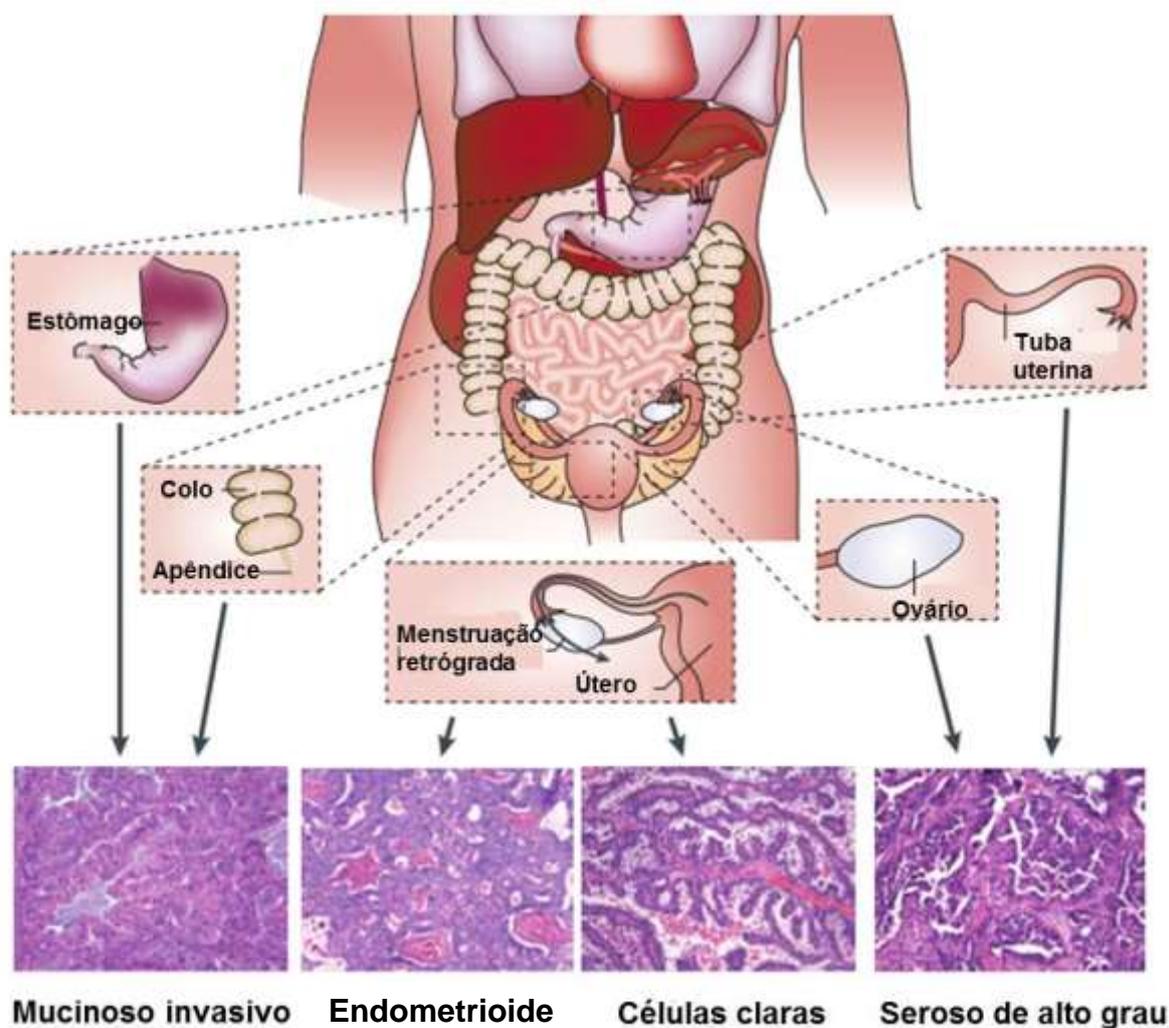


Figura 3 - Representação dos diferentes sítios de origem do CAO, conforme modelo proposto por VAUGHAN e colaboradores em 2011. CAO refere-se ao termo coletivo dado ao grupo de tumores invasivos que se desenvolve no ovário. Tumores mucinosos invasivos são, em sua maioria, metástases no ovário de tumores originados no trato gastrointestinal, incluindo cólon, apêndice e estômago. Tumores endometrioides e de células claras, por sua vez, são derivados da endometriose, a qual, por sua vez, é associada com a menstruação retrógrada a partir do endométrio. Tumores serosos de alto grau derivam da superfície do ovário e/ou da porção distal das tubas uterinas, sendo que a contribuição relativa de cada um dos sítios ainda é desconhecida. Adaptado de VAUGHAN et al., 2011.

Um dos aspectos fundamentais para nortear a escolha da estratégia terapêutica a ser empregada contra o CAO é o estadiamento correto dos tumores no momento do diagnóstico. O estadiamento define o quão disseminada está a doença, sendo que a acurácia desse refletirá diretamente na escolha do tratamento, uma vez que definirá o seu prognóstico (NCI, 2014). O método classicamente utilizado na clínica

para o estadiamento é aquele da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), o qual foi implementado em 1988.

Contudo, devido a novos achados moleculares que descrevem o CAOv como uma doença heterogênea formada por diferentes grupos de malignidades epiteliais (discutido no item Classificação do CAOv), o comitê de oncologia do FIGO revisou e atualizou, em 2013, a classificação previamente definida da doença. As mudanças mais marcantes em relação à classificação anterior, do ponto de vista da origem e características histológicas dos tumores, estão na descrição do sítio anatômico primário da doença, incluindo, além do ovário, as tubas uterinas e a origem peritoneal. Além disso, os subtipos histológicos (HGSC, carcinoma seroso de baixo grau, carcinoma mucinoso, carcinoma de células claras e carcinoma endometriode) também são descritos (ZEPERNICK; MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

2.6. TRATAMENTO DO CAOv

Conforme discutido anteriormente, devido à ausência de métodos diagnósticos precisos, a grande maioria das pacientes é diagnosticada quando a doença encontra-se em estadio avançado. A sobrevida em cinco anos de até 90% correlacionada à doença de baixo risco (estadio I) decresce progressivamente com o avanço da doença, chegando a ser de apenas 11% em pacientes com doença no estadio IV (revisado por MCGUIRE; MARKMAN, 2003). Devido ao diagnóstico tardio, a terapia do CAOv é bastante agressiva, associando cirurgia citorrredutora à quimioterapia adjuvante.

A cirurgia continua sendo o tratamento de primeira escolha para o CAOv (LISTER-SHARP, MCDONAGH, KHAN, 2000). A extensão do tecido removido varia de acordo com o grau de malignidade da doença e com a idade (reprodutiva) da

paciente, podendo abranger a remoção apenas do ovário acometido e chegar até a histerectomia com salpingoosterectomia bilateral e remoção de linfonodos para-aórticos (revisado por MCGUIRE; MARKMAN, 2003). Na maioria das pacientes, é possível atingir tratamento cirúrgico ótimo, sendo o prognóstico da doença diretamente relacionado ao sucesso da cirurgia citorrredutora (revisado por MCGUIRE; MARKMAN, 2003).

A evolução da quimioterapia do CAO V no período entre meados da década de 1980 até início dos anos 2000 foi revisada por McGuire e Markman (MCGUIRE; MARKMAN, 2003) (Figura 4).

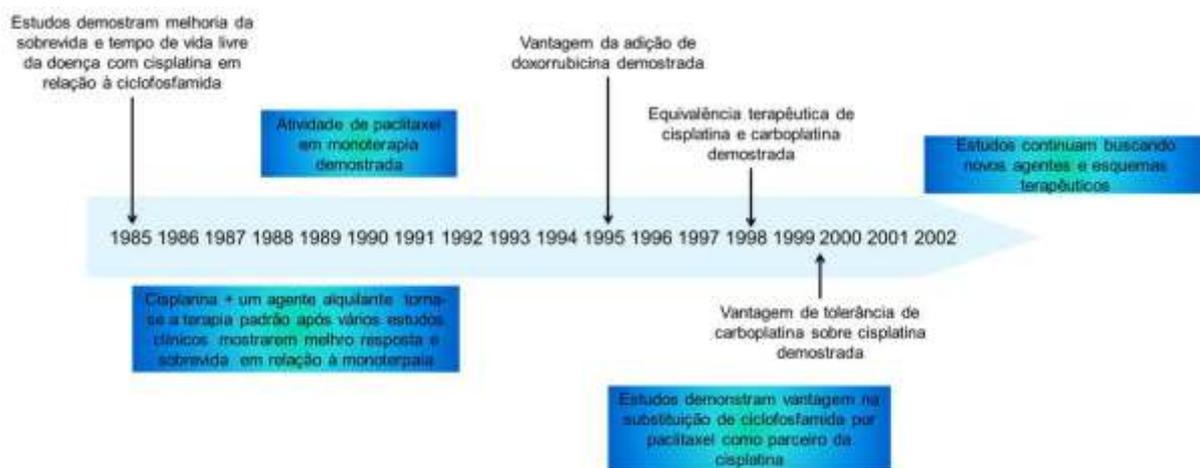


Figura 4 - Evolução da quimioterapia do CAO V de 1985 a 2002. Adaptado de MCGUIRE; MARKMAN, 2003.

Inicialmente, o tratamento do CAO V era feito principalmente com os agentes alquilantes melfalano, ciclofosfamida, clorambucil e tiotepa, todos em monoterapia, os quais atuam alquilando moléculas biológicas como proteínas, RNA e DNA. Esses agentes intercalam-se à molécula de DNA, ligando-se a uma ou às duas fitas da molécula. Essa propriedade consiste em sua ação antineoplásica primária, ao interferir com a replicação do DNA e levar a célula à apoptose. A resposta completa de portadoras de CAO V ao tratamento com os agentes alquilantes supracitados era

de aproximadamente 20%, com sobrevida das mesmas de 17 a 20 meses. Contudo, uma série de estudos iniciados na década de 1970 mostrou a vantagem terapêutica da cisplatina sobre os demais agentes alquilantes em monoterapia, inclusive no tratamento de pacientes cujos tumores mostraram-se refratários à terapia até então convencional, com respostas de 26,5% e 29% (demais agentes alquilantes vs. cisplatina), respectivamente (revisado por MCGUIRE; MARKMAN, 2003). Em meados da década de 1980, o primeiro estudo randomizado comparando a terapia de primeira linha com cisplatina e com ciclofosfamida demonstrou maior sobrevida e duração da resposta em pacientes que receberam a terapia com o derivado de platina (LAMBERT; BERRY, 1985). Após a publicação desses resultados, juntamente com uma série de outros mostrando a vantagem da terapia combinada, combinações de cisplatina com outros agentes alquilantes passaram a ser a terapia de primeira escolha para o tratamento do CAO (MCGUIRE; MARKMAN, 2003).

Nos anos subsequentes, diversos estudos demonstraram o benefício terapêutico da adição de antraciclina na terapia do CAO. As antraciclina são uma classe de antibióticos com efeito citotóxico que agem de forma semelhante aos agentes alquilantes ao intercalarem-se ao DNA, interferindo com o ciclo celular. As antraciclina também são inibidoras de topoisomerase II. Esquemas multiterápicos com cisplatina, ciclofosfamida e doxorubicina mostraram modesta, mas significativa melhora na sobrevida de pacientes de CAO quando comparadas àquelas tratadas com carboplatina apenas (ICON2, 1998). Entretanto, a cardiotoxicidade da doxorubicina muitas vezes se sobrepõe ao seu benefício terapêutico. Por isso, a droga se tornou obsoleta nos Estados Unidos (MCGUIRE; MARKMAN, 2003), ao menos até o desenvolvimento da forma microssomal peguilada da doxorubicina, a qual se acumula predominantemente em tecidos microvascularizados e confere

menor toxicidade sistêmica em comparação à forma convencional da droga (GABIZON, 2001).

Um dos maiores avanços na terapia do CAOV foi a introdução dos taxanos no esquema terapêutico de combate à doença. Esses compostos possuem a propriedade única de promover a montagem dos microtúbulos, impedindo a sua despolimerização, e, por fim, interferindo na mitose em células normais e malignas. Dois estudos randomizados nos quais a ciclofosfamida foi substituída por paclitaxel mostraram a vantagem terapêutica do uso do último, com aumento da sobrevida de 24 para 38 meses e de 25,8 para 35,6 meses quando ciclofosfamida ou paclitaxel foi usado em combinação com cisplatina, respectivamente (revisado por MCGUIRE; MARKMAN, 2003). Contudo, o aumento da resposta à terapia combinada com cisplatina e taxanos veio acompanhado por toxicidade importante. A fim de reduzir a toxicidade do tratamento à doente de CAOV, substituiu-se a cisplatina pelo seu análogo carboplatina. Demonstrou-se, então, a equipotência terapêutica da carboplatina e da cisplatina, mas a menor toxicidade da primeira quando comparada à última (AABO et al., 1998).

De forma geral, o tratamento do CAOV evoluiu de esquema baseado em agentes alquilantes para a terapia combinada de derivados de platina associados ao taxol, considerado, hoje, o tratamento de primeira linha contra a doença (LISTER-SHARP, MCDONAGH, KHAN, 2000).

Embora tenha havido avanços significativos quanto ao entendimento das bases moleculares do CAOV, o tratamento vigente contra a enfermidade ainda não é considerado curativo, aspecto associado, primariamente, ao fenótipo quimiorresistente das células tumorais. Como consequência, não obstante a

resposta inicial satisfatória à terapia ser de 70-80%, mesmo em pacientes com doenças em estadios avançados (III e IV), a maioria das pacientes progride com doença recorrente e resistente ao tratamento (PAES et al., 2011; USHIJIMA, 2010). Como resultado, as taxas de resposta completa ao tratamento e o tempo de sobrevida da doente de CAO V (esse entre 5 a 20%), apesar de terem aumentado, continuam insatisfatórios (Figura 5) (KIKKAWA et al., 2006 apud LAIOS et al., 2008). Dessa forma, pode-se dizer que a ocorrência de CAO V quimiorresistente, associada ao diagnóstico tardio da doença, configura um dos principais fatores associados ao seu prognóstico ruim. É importante citar que ensaios *in vitro* executados na década de 1970 demonstraram que células cancerosas podem desenvolver resistência cruzada a múltiplas drogas pela ativação de mecanismos celulares diversos, como mostrado na Figura 6 (GOTTESMAN et al., 2006).

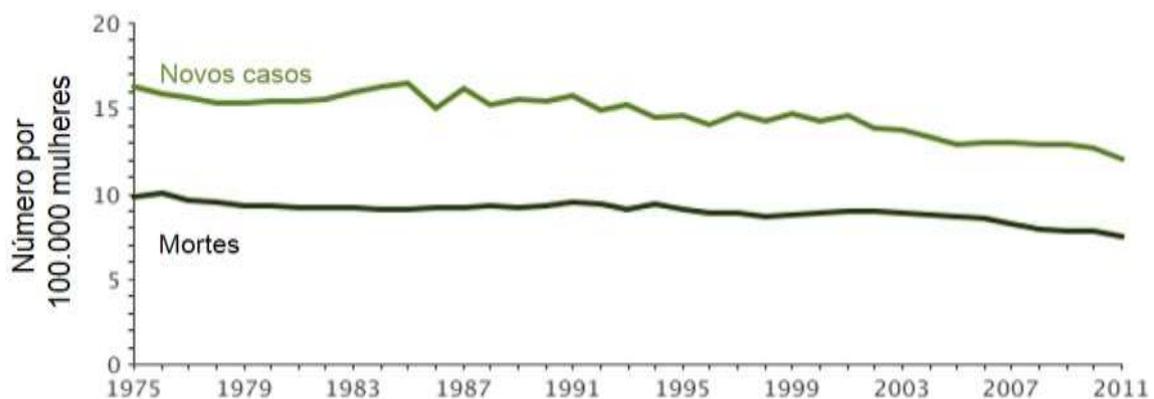


Figura 5 – Incidência e mortalidade do CAO V nos Estados Unidos de 1975 a 2011. O gráfico mostra que não houve alterações na incidência ou na mortalidade do CAO V no período de 1975 a 2011. Fonte: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.

A resistência às drogas pode ser intrínseca ou adquirida, sendo ambos processos multifatoriais resultantes de alterações genéticas e epigenéticas múltiplas sofridas pelas células cancerosas. Funcionalmente, as mesmas acarretam em efluxo da droga, aumento da habilidade celular de reparar o DNA, mudanças em pontos de controle do ciclo celular, ativação de genes específicos, desestruturação da matriz

extracelular, dentre outros (revisado por NIERO et al., 2014; SHERMAN-BAUST et al., 2003). Recentemente, a quimiorresistência também vem sendo atribuída a subpopulações celulares da massa tumoral, denominadas células-tronco tumorais (CSC, do inglês *cancer stem cells*), às quais possuem resistência intrínseca à terapia e estariam envolvidas na iniciação, progressão e recidiva tumoral (revisado por ALISON; LIM; NICHOLSON, 2011). Ainda, o papel do microambiente na progressão tumoral também vem sendo estudado. Hanahan e Weinberg, no trabalho que discute os seis traços que definem uma célula tumoral, inclusive atribuem ao microambiente, através de fatores secretados tanto pelas células tumorais quanto pelas demais células que o compõem, a aquisição de parte dessas características (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

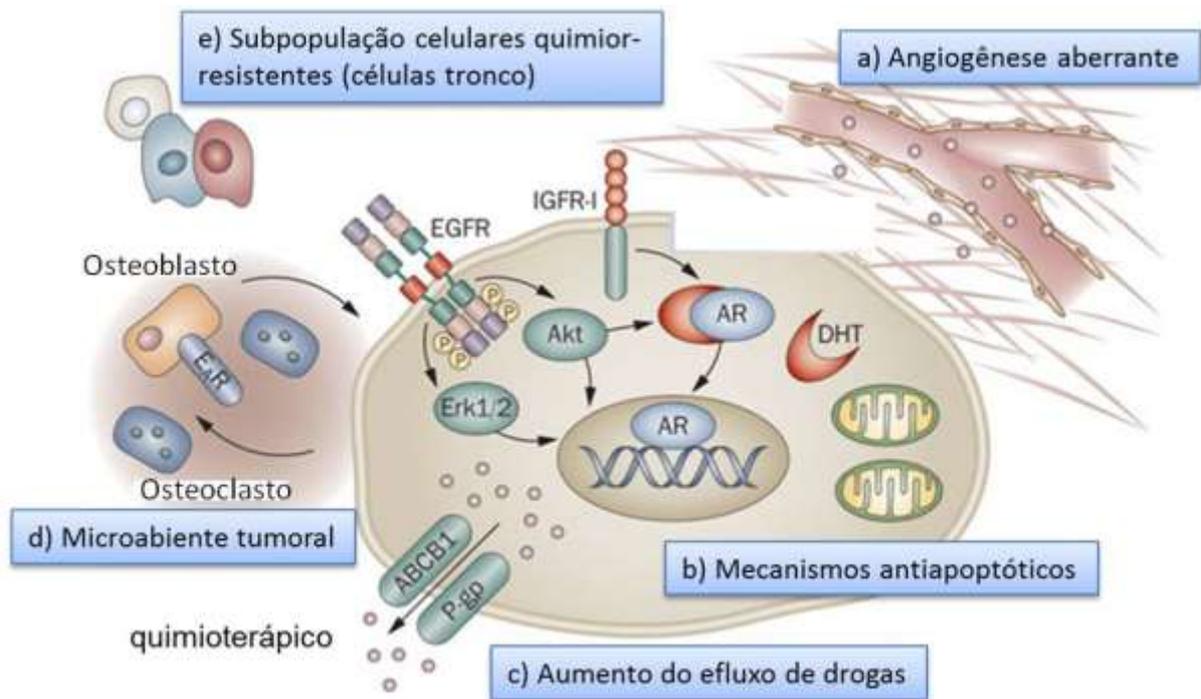


Figura 6 - Mecanismos celulares tumorais associados à resistência à quimioterapia. Alguns dos mecanismos gerais envolvidos na quimiorresistência são exemplificados: (a) angiogênese aberrante, levando ao aumento do aporte energético e restringindo a acessibilidade dos fármacos; (b) ativação de mecanismos antiapoptóticos; (c) aumento do efluxo da droga, impedindo que essa atinja seus alvos intracelulares; (d) microambiente tumoral, o qual age promovendo o desenvolvimento do tumor e regulando a resposta imunitária antitumoral; (e) presença de subpopulações celulares quimiorresistentes, como, por exemplo, células-tronco tumorais. Adaptado de SERUGA; OCANA; TANNOCK, 2011.

CAPÍTULO 1: PAPEL DE NAC1 E BCL6 NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.

3. INTRODUÇÃO

3.1. A FAMÍLIA BTB/POZ DE REGULADORES TRANSCRICIONAIS

A família BTB/POZ (*brick-a-brac tramtrack-broad/pox vírus and zinc finger*) é um grupo evolutivamente conservado de reguladores transcricionais (revisado por BEAULIEU; SANT'ANGELO, 2011). Os membros dessa família são caracterizados por possuírem, em sua extremidade C-terminal, um ou mais domínios de ligação ao DNA tipo dedo de zinco (ZF) e, em sua extremidade N-terminal, um domínio BTB/POZ, que medeia interações proteína-proteína (revisado por BEAULIEU; SANT'ANGELO, 2011). A regulação da expressão gênica ocorre através da ligação sequência-específica do domínio ZF das proteínas regulatórias nos genes-alvo, juntamente com o recrutamento de co-fatores envolvidos com a remodelação da cromatina e ativação/silenciamento da transcrição.

3.1.1. A PROTEÍNA ASSOCIADA AO NÚCLEO ACUMBENTE-1

A proteína associada ao núcleo acumbente-1 (NAC1) é uma proteína nuclear pertencente à família BTB/POZ. Essa proteína foi inicialmente identificada e clonada como um fator de transcrição do núcleo acumbente, uma estrutura prosencefálica única envolvida em motivação por recompensa e comportamento aditivo (CHA et al., 1997; KOOB, 1996; MACKLER et al., 2008). NAC1 contém dois domínios de interação proteína-proteína BTB/POZ e BEN (Figura 7). O primeiro, que caracteriza essa proteína como membro da família BTB/POZ, permite que essa interaja com os membros dessa família, formando homo ou heterodímeros. O segundo, por outro lado, é encontrado em diversas proteínas e está associado à formação de estruturas de cromatina de alto grau organizacional e recrutamento de fatores modificadores de cromatina na regulação transcricional (PEREZ-TORRADO; YAMADA;

DEFOSSEZ, 2006). No caso de NAC1, sabe-se que essa interage com as histonas desacetilases HDAC3 e HDAC4 (ABHIMAN; IYER; ARAVIND, 2008). Recentemente foi descrito que proteínas que possuem domínios BEN também podem ligar-se diretamente ao DNA através desse domínio (DAI et al., 2013). Ainda, verifica-se que diferentemente de outros membros da família BTB/POZ, NAC1 não possui o domínio ZF necessário para sua interação direta com o DNA, dependendo da interação com outras proteínas dessa família para fazê-lo. De fato, em 2009, Korutla e colaboradores demonstraram que NAC1 interage com o fator de transcrição proteína de linfoma de células B (BCL6, do inglês *b-cell lymphoma protein 6*), atuando como um co-repressor transcricional (KORUTLA et al., 2009).



Figura 7 - Representação esquemática da estrutura de NAC1. NAC1 possui um domínio de homo- ou hetero-oligomerização BTB/POZ na extremidade N-terminal e o domínio de interação proteína-proteína BEN na extremidade C-terminal.

NAC1 também é capaz de interagir com outras proteínas regulatórias, como nanog, integrando, assim, uma rede regulatória que compreende diversos fatores de transcrição envolvidos na manutenção da pluripotência em células-tronco embrionárias (WANG et al., 2006). Além disso, NAC1 apresenta funções relacionadas a diversos processos biológicos e celulares como no estabelecimento de padrões ósseos em camundongos (YAP et al., 2013) e durante a divisão celular, sendo necessária para a citocinese (YAP et al., 2012). NAC1 também possui papel no estabelecimento e progressão do câncer, tendo sido relatada a sua superexpressão em diversos tipos de tumores, incluindo naqueles do cérvix, endométrio e ovário (ISHIKAWA; NAKAYAMA, 2010; NAKAYAMA et al., 2006; YEASMIN et al., 2012). Dentre as funções exercidas por NAC1 no CAO (a serem

discutidas nos próximos parágrafos), muitas também são atribuídas às CSC, tais como migração celular, resistência à quimioterapia, aumento da proliferação, entre outras.

A primeira relação entre NAC1 e o CAOv foi estabelecida em 2006, quando se demonstrou que esse estava superexpresso em HGSC, em comparação a células de superfície de ovário e cistoadenomas benignos de ovário (NAKAYAMA et al., 2006). Analisando 21 casos para os quais havia amostras pareadas de tumores primários e recorrentes, foi possível observar que NAC1 tinha sua expressão aumentada nos recorrentes, após a administração de quimioterapia. Esses dados são corroborados por aqueles de Davidson e colaboradores, que mostraram um aumento da expressão de NAC1 após administração tanto de derivados de platina quanto de taxanos (DAVIDSON et al., 2007). Esse trabalho ainda mostrou uma maior expressão de NAC1 em tumores metastizados, ou seja, nas células presentes no líquido ascítico quando comparado com o tumor sólido. Apesar de nenhuma associação entre a expressão de NAC1 com o grau do tumor, tipo histológico, quantidade de doença residual, idade da paciente, ou local da ascite (peritoneal ou pleural), há uma associação entre essa expressão e a diminuição do tempo de vida livre de doença (tempo entre a remoção do tumor primário e ocorrência da recidiva) (DAVIDSON et al., 2007).

Em relação às funções de NAC1 no câncer, sabe-se que sua homo-oligomerização é necessária para a proliferação e sobrevivência de células tumorais, uma vez que ferramentas que impedem essa oligomerização acarretam diminuição da proliferação, parada do ciclo celular na fase G2/M e aumento de apoptose, como indicado pelo aumento da marcação de anexina V (NAKAYAMA et al., 2006). Um dos mecanismos propostos para esses processos é através do gene *Gadd45/GIP1*,

que codifica a proteína que interage com a proteína induzida por dano ao DNA 45-γ, o qual tem efeito anti-tumoral e foi descrito como um alvo de regulação negativa de NAC1 (NAKAYAMA et al., 2007).

Devido ao aumento da expressão de NAC1 em tumores recidivados após a administração de quimioterápicos, suspeitou-se do envolvimento desse gene na quimiorresistência. Ishibashi e colaboradores induziram a resistência à cisplatina e ao taxol em linhagens de células de ovário humana e observaram que NAC1 estava superexpresso nas células resistentes a taxol, apenas (ISHIBASHI et al., 2008). Ainda, através de experimentos independentes, mas complementares, eles foram capazes de mostrar que NAC1 é necessário e suficiente para induzir essa resistência ao reverter a resistência ao taxol através do silenciamento gênico de NAC1, mediado por RNA de interferência (siRNA), e induzi-la através da expressão ectópica de NAC1. Ainda nesse contexto, outro estudo mostrou a superexpressão de NAC1 após a indução de resistência a taxol em três linhagens de CAO, bem como, mais uma vez, associou a aquisição de resistência ao taxol com a expressão ectópica de NAC1, e o aumento da sensibilidade ao quimioterápico após o seu silenciamento gênico (JINAWATH et al., 2009). Nesse estudo foi demonstrado que *Gadd45GIP1*, um alvo de regulação negativa de NAC1 previamente descrito (NAKAYAMA et al., 2007), estaria envolvido na resistência a taxol mediada por NAC1. A relação de NAC1 com a resistência à cisplatina também foi demonstrada no CAO, uma vez que a supressão da sua função, por silenciamento gênico ou através da prevenção de sua homo-oligomerização, levou ao aumento da sensibilidade das células à cisplatina, juntamente com um aumento da apoptose (ZHANG et al., 2012a). Nesse aspecto, é sabido que a autofagia tem papel protetor na célula tumoral, uma vez que representa uma rota de escape do processo

apoptótico (revisado por MAIURI et al., 2007). Em células de CAO, a supressão da função de NAC1, seja por seu silenciamento gênico, seja através da prevenção de sua homo-oligomerização, leva a uma diminuição da autofagia induzida por cisplatina em um processo mediado por HMGB (ZHANG, et al., 2012a), um regulador da autofagia (TANG et al., 2010).

Por fim, através de análise de microarranjo de cDNA foi possível identificar diversos genes regulados por NAC1 (GAO et al., 2014b). Devido ao seu papel no CAO, induzindo a proliferação celular, a migração/motilidade e a expressão de marcadores mesenquimais em detrimento a epiteliais (GAO; SHIH; WANG, 2012), a regulação da expressão de *forkhead box Q1 (FOXQ1)* por NAC1 foi melhor caracterizada. Mostrou-se também que NAC1 é essencial e suficiente para a ativação da transcrição de *FOXQ1* (GAO et al., 2014b). Contudo, conforme foi mencionado anteriormente, NAC1 não se liga diretamente ao DNA através do seu domínio BTB e a identificação de fatores de transcrição que atuem como parceiros de NAC1 nessa regulação é fundamental.

3.1.2. A PROTEÍNA 6 DE LINFOMA DE CÉLULAS B

BCL6 foi por muito tempo o oncogene mais bem caracterizado da família BTB/POZ. Esse gene é constitutivamente expresso em linfomas de células B, além de já ter sido identificado superexpresso em alguns tumores sólidos, como carcinoma colorretal e câncer de mama (LOGARAJAH et al., 2003; SENA et al., 2013). Ainda, recentemente, foi demonstrado que *BCL6* está superexpresso no CAO, onde sua expressão está negativamente correlacionada com a sobrevida livre de doença das pacientes, além de induzir a proliferação, migração e invasão de linhagens celulares derivadas de CAO (WANG et al., 2015a). Ainda, *BCL6* possui um mecanismo de

autorregulação negativa, onde a proteína BCL6 é capaz de se ligar à região regulatória do gene *BCL6*, localizada no éxon 1, prevenindo a sua transcrição. Modificações genéticas nessa sequência levam à expressão constitutiva de BCL6 em linfomas difusos de células B (WANG et al., 2002). Dois membros da família BTB/POZ, CtBP e PATZ, já foram identificados como co-repressores de BCL6 (MENDEZ et al., 2008; PERO et al., 2012). Ainda, a interação de NAC1 e BCL6, funcionando como co-repressores transcricionais, já foi demonstrada previamente através de ensaios de duplo híbrido em linhagens celulares neuronais (N2A) e não neuronais (HEK293T) (KORUTLA et al., 2009).

4. OBJETIVO GERAL

Identificar o mecanismo regulatório da transcrição gênica exercido por NAC1.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se NAC1 e BCL6 interagem, regulando a expressão gênica no câncer de ovário:
 - Identificar a região de NAC1 que promove sua interação com BCL6 através de ensaios de co-imunoprecipitação;
 - Verificar se BCL6 liga-se ao promotor de *FOXQ1* de forma específica e dependente de NAC1 através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina;
 - Verificar o efeito da ligação do complexo NAC1/BCL6 na expressão de *FOXQ1* através de ensaios de atividade promotora.
- Verificar se existe correlação entre a expressão de NAC1 e BCL6:
 - Analisar a expressão de *NACC1* e *BCL6* em linhagens de CAOV por qPCR;
 - Analisar a expressão de NAC1 e BCL6 em tumores ovarianos por imunoistoquímica;
 - Analisar o efeito da modulação da expressão de *NACC1* na expressão de *BCL6* em células de CAOV e no baço de camundongos *Nacc1*^{-/-}.
- Identificar novos alvos de regulação do complexo NAC1/BCL6 através de microarranjo de cDNA.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram adquiridas comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC), cedidas pelo *National Institute of Health* (NIH), ou estabelecidas na *Johns Hopkins University* (JHU), nos Estados Unidos. São estas: a linhagem de câncer de colo de útero humano HeLa (ATCC); a linhagem de carcinoma de mama MCF7 (ATCC), a linhagem de células embrionárias de rim humano HEK293T (ATCC), a linhagem de superfície de ovário humano saudável OSE4 (NIH); e as linhagens de CAOV humano, OVCAR-3 (NIH), OVCAR-5 (NIH), OVCAR-8 (NHI), JH514 (JHU), SKOV3 (ATCC) e a sua derivada com resistência induzida a taxol SKOV3^{TR} (JINAWATH et al., 2009). Ainda, utilizou-se a célula HeLa tTA, um sistema de NAC1 disfuncional gerado pela expressão do domínio BTB de NAC1 (N130) induzida pela remoção da doxíciclina do meio de cultura, conforme descrito anteriormente (NAKAYAMA et al., 2006).

A não ser que especificado de forma diferente, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cellgro) e 1% de solução estabilizada de Penicilina-Estreptomicina (concentração final de 10 UI/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente) (Sigma). A linhagem SKOV3^{TR} foi mantida no meio supracitado acrescido de 0,25 µM de taxol. Todas as células foram mantidas em incubadora de cultivo celular, na temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ até subconfluência.

5.2. CAMUNDONGOS *KNOCK-OUT* PARA *NACC1*

Os experimentos com camundongos *knock-out* para *NACC1* (*Nacc1*^{-/-}) foram conduzidos no Biotério do *Cancer Research Building* da Universidade Johns

Hopkins, Baltimore, Maryland, Estados Unidos, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Instituição (protocolo número MO09M473). Para os experimentos, animais *Nacc1*^{-/-} foram eutanasiados e tiveram seus baços removidos para preparação de RNA. Para tal, até 30 mg de tecido foram utilizados para isolamento do RNA utilizando-se RNAeasy® Mini Kit (Qiagen) após lise utilizando-se tampão ALT (Qiagen). A síntese de cDNA e a análise da expressão gênica de *BCL6* foram realizadas conforme descrito no item Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

5.3. TRANSFECCÕES

Para os ensaios de transfecção, tanto para expressão ectópica, quanto para silenciamento gênico, as células foram semeadas em placas de 6 poços e a transfecção deu-se quando a confluência era de 80-90%. Antes da transfecção, os poços foram lavados com meio Opti-MEM (Invitrogen) e 500 µL de meio RPMI, suplementado com 10% de SFB, foram adicionados a cada poço. Para a transfecção utilizaram-se Lipofectamine® 2000 ou Lipofectamine® RNAiMAX, que foram diluídos em 250 µL/poço de meio Opti-MEM e incubados por 5 min. Nos experimentos de silenciamento gênico utilizou-se cada um dos siRNA na concentração final de 100 pmol/mL, em 250 µL de Opti-MEM, enquanto nos experimentos de expressão ectópica utilizaram-se 3 µg de DNA diluídos no mesmo volume de Opti-MEM. Em seguida, misturou-se o conteúdo do tubo contendo Lipofectamine® com aquele contendo o siRNA ou plasmídeo, e incubou-se por 20 min antes de adicionar o volume total de 500 µL/poço do complexo com Lipofectamine®. Incubou-se por 6-18h antes de realizar a troca de meio. As análises foram realizadas entre 24 e 72h após a transfecção.

Os plasmídeos de expressão codificando NAC1 (pcDNA6-NAC1-V5), bem como as suas cinco formas truncadas, foram descritos anteriormente (JINAWATH et al., 2009; NAKAYAMA et al., 2006). Dois siRNA tendo como alvo NAC1, dois siRNA tendo como alvo BCL6 e um siRNA controle (siCTRL; Stealth RNA® Negative ControlMed CG) foram adquiridos da Invitrogen. As sequências-alvo de NAC1 (siNAC1) são ACAUGAUGGGUGUGGAGCAUGGCUU e CAGCAGAUCCUCAGCUUCUGCUACA. As sequências-alvo de BCL6 (siBCL6) são GCCAGCCGGCUCAAUAACAUCGUUA e UAACGAUGUUUUGAGCCGGCUGGC.

5.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)

A extração de RNA foi realizada com RNAeasy® Kit (Qiagen). Para a síntese da fita de DNA complementar, utilizou-se iScript® cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). Os níveis relativos de expressão dos transcritos foram medidos utilizando-se o sistema CFX96® Real-PCR Detection System (Bio-Rad) e quantificados pela intensidade da fluorescência de SYBR® green I (Invitrogen). Os *primers* utilizados nesse estudo estão descritos na Tabela 1. As médias de Ct de medidas em triplicata foram obtidas. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada pelo método DDCT utilizando a expressão de um gene de referência para normalização dos dados. O gene da proteína precursora amiloide (*APP*, do inglês *amyloid precursor protein*) foi utilizado para normalização dos dados em experimentos com linhagens celulares humanas, e o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi utilizado para normalização dos dados com amostras murinas.

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados nos ensaios de qPCR.

Gene-alvo	Aplicação	Sequência
APP F	qPCR	5'- AAAGAACTTGTAGGTTGGATTTTCG-3'
APP R	qPCR	5'- GTGAAGATGGATGCAGAATTCCG-3'
BCL6 F	qPCR	5'-TGGGGTTCTTAGAAGTGGTGA-3'
BCL6 R	qPCR	5'-CAATGCCTTGCTTCACAGTC-3'
NAC1 F	qPCR	5'-AAGCTGAGGATCTGCTGGAA-3'
NAC1 R	qPCR	5'-CCAGACACTGCAGATGGAGA-3'
mouseBCL6 F	qPCR	5'-AAAGGCCGGACACCAGTTTT-3'
mouseBCL6 R	qPCR	5'-AACGTCCGTCAAGATGTCCC-3'
mouseGAPDH F	qPCR	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
mouseGAPDH R	qPCR	5'- GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'
BCL6 (227/421) F	Ch-IP	5'-GGGTTCTTAGAAGTGGTG-3'
BCL6 (227/421) R	Ch-IP	5'-CAAAGCATTTGGCAAGAG-3'
FOXQ1(-1000) F	Ch-IP	5'-ATCCAAAAAGGCGCATACAA-3'
FOXQ1(-1000) R	Ch-IP	5'-AGAAATTGCGCAGGACACTT-3'
FOXQ1(-800) F	Ch-IP	5'-CGTAAGCAGCATCGTTTTCA-3'
FOXQ1(-800) R	Ch-IP	5'-CCTAGGGGGACACCTGAAG-3'
FOXQ1(-150) F	Ch-IP	5'-ACATCATCCGGCACCATT-3'
FOXQ1(-150) R	Ch-IP	5'-CTCGTTAAAGAGCCCAGGAG-3'

F, *forward*; R, *reverse*

5.5. ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DE *BCL6*

A sequência promotora (-2000 a +1000) foi recuperada utilizando-se os pacotes Biostring e BSgenome do Bioconductor 2.12 (GENTLEMAN et al., 2004). A matriz de frequência de posições do motivo de *BCL6* (Transfact ID: M01171) foi obtida do Cistome (http://cistrome.org/~jian/motif_collection/databases/Cistrome/pwm/M01171.pwm), a qual foi convertida em uma matriz de peso das posições com as frequências das bases de *background* calculadas de acordo com a sequência do promotor (WASSERMAN; SANDELIN, 2004). A ocorrência de motivos de *BCL6* na

sequência promotora foi identificada pelo uso da função `matchPWM()` no pacote Biostring com o parâmetro `min. score=70%`. O *log-odds score* de cada ocorrência do motivo de BCL6 foi calculado pela função `PWMscoreStartingAt()` no pacote Biostring.

5.6. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA

A preparação dos extratos para imunoprecipitação de cromatina (Ch-IP) foi realizada conforme previamente descrito (THIAVILLE et al., 2012). Brevemente, células das linhagens OVCAR-3, MCF7, HeLa e HeLa tTA foram semeadas em placas de cultura de 150 mm de diâmetro e cultivadas até atingirem 80-90% de confluência. As células foram fixadas com paraformaldeído (1%, concentração final) antes de realizar o *cross-link* com peróxido di-tert-butílico (DTBP). Anticorpos policlonais de coelho para BCL6 (Santa Cruz, SC-858) e NAC1 (Santa Cruz, SC-98638), ou controle isotípico IgG de coelho (Abcam, ab37415), foram utilizados para a imunoprecipitação. O DNA imunoprecipitado foi utilizado em reações de qPCR. Os *primers* utilizados nesses experimentos são apresentados na Tabela 1.

5.7. CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Células da linhagem HEK293T foram utilizadas nos ensaios de co-imunoprecipitação (Co-IP), conforme previamente descrito (NAKAYAMA et al., 2006). Brevemente, uma série de construtos em vetores pcDNA6 contendo diferentes mutantes de deleção de NAC1, incluindo N130 (codificando os aminoácidos 1-129 da porção N-terminal), M147 (codificando os aminoácidos 195-342 da porção média), M171 (codificando os aminoácidos 195-366 da porção média), C186 (codificando os aminoácidos 342-528 da porção C-terminal) e C250 (codificando os aminoácidos 257-528 da porção C-terminal) e NAC1 selvagem, todos em fusão com V5, foram co-transfectados com pcDNA6-BCL6-FLAG. Os

lisados celulares foram preparados utilizando-se tampão de lise contendo 1% de NP-40. Para as reações de imunoprecipitação, proteínas fusionadas com V5 foram imunoprecipitadas com *beads* de agarose anti-V5 (Sigma); enquanto aquelas fusionadas com FLAG o foram com gel de afinidade M2 FLAG (Sigma). Tampão Laemmli (Bio-Rad) suplementado com beta-mercaptoetanol foi utilizado para eluir as proteínas. As proteínas foram analisadas por imunoblot.

5.8. IMUNOBLLOT

Para preparação dos extratos proteicos, utilizou-se tampão de lise (Tris 50mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, NP40 1%) com coquetel de inibidores de protease 1x (Sigma), que foi adicionado às células antes de uma incubação de 30 min no gelo, seguida de centrifugação a 14.000 rpm, por 30 min, a 4°C. Para as análises, utilizou-se a fase solúvel dos extratos que teve seu conteúdo proteico quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a corrida eletroforética, utilizaram-se 20 µg de proteína por canaleta em gel de 12% de poliacrilamida. Procedeu-se a transferência para membrana de PVDF e bloqueio à temperatura ambiente com leite em pó ou albumina bovina 1%, de acordo com as especificações do anticorpo em uso. A incubação com os anticorpos primários anti-V5 (Sigma, V8137) ou anti-FLAG (Sigma®, F1804) foi feita durante a noite, a 4°C, com agitação. Utilizaram-se anticorpo secundário isotipo específico, conjugado a HRP, e reagente ECL® (GE Healthcare) para visualização dos resultados. A aquisição das imagens foi realizada utilizando-se Chemi-Doc® XRS System (Bio-Rad).

5.9. ENSAIO DE ATIVIDADE PROMOTORA PELO GENE REPÓRTER LUCIFERASE

Células HeLa foram transfectadas com siNAC1, siBCL6 ou siCTRL. Após 24h, as células foram transfectadas com o plasmídeo controle pGL3 ou com o construto contendo o gene da Luciferase sob controle do promotor de *FOXQ1*, pGL3-FOXQ1, e com o plasmídeo repórter pRLRenilla (Promega) utilizando Lipofectamine® LTX (Invitrogen). As atividades de Luciferase e de Renilla foram medidas 24h depois da transfecção usando um luminômetro (PerkinElmer) e o reagente Dual-Glo® luciferase (Promega). A atividade da Luciferase foi normalizada pela atividade de Renilla.

5.10. IMUNOISTOQUIMICA

Um total de 51 amostras de HGSC, fixadas em formalina e embebidas em parafina, foram obtidos do Departamento de Patologia do Hospital Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, Estados Unidos. Os tecidos parafinados foram dispostos em microarranjos de tecido para garantir que todos os tecidos fossem corados sob as mesmas condições. Um anticorpo monoclonal anti-NAC1 produzido em camundongo foi utilizado. A sua especificidade foi confirmada por *western blot*, conforme previamente descrito (NAKAYAMA et al., 2006). Um anticorpo monoclonal anti-BCL6 produzido em camundongo foi adquirido comercialmente (SC-858, Santa Cruz Biotech). Uma solução de citrato para recuperação de antígeno (*Target Retrieval Solution*, DAKO) foi utilizada (95-100°C por 20 min). Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário a 4°C, durante a noite, e com o anticorpo secundário à temperatura ambiente, por 30min. O desenvolvimento colorimétrico foi detectado utilizando EnVision® + System (DAKO). Por fim, os cortes foram contracolorados com hematoxilina e a imunorreatividade recebeu um escore por dois

investigadores, um deles um patologista, baseado na intensidade da coloração, variando de 0 a 3+.

5.11. MICROARRANJO DE cDNA

Para a análise de microarranjo de cDNA, células da linhagem OVCAR-5 foram transfectadas com siNAC1, siBCL6, siCTRL e coletadas 72h após a transfecção. O RNA total foi isolado usando o kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) e as amostras de cDNA foram hibridizadas na plataforma Human HT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina). Normalização *quantile* foi realizada para normalizar os dados brutos. Comparamos os perfis de expressão gênica globais entre células tratadas com siNAC1, siBCL6 e siCTRL, e definimos genes que estavam *upregulated* ou *downregulated* como aqueles que apresentavam uma alteração $\leq 0,5$ ou $\geq 2,0$, comparados com o grupo controle. A análise de efeitos *downstream* foi realizada utilizando-se *Ingenuity Pathways Analysis Systems* (www.ingenuity.com). Essa análise é baseada nos efeitos causais esperados entre os genes analisados e as funções biológicas. Os efeitos causais esperados são derivados da literatura e compilados na base de dados *Ingenuity Knowledge Base* e permitem a predição para cada função baseada na direção da mudança de expressão gênica.

5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Análises para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos experimentais foram realizadas através de Teste t de Student não-pareado. Análises para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com uma variável foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Turkey. Análises para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com duas variáveis foram

realizadas através de ANOVA de duas vias com pós-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 em cada um dos experimentos são indicados na legenda das figuras. Um valor $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas no *software* GraphPadPrism v.5.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. NAC1 E BCL6 FORMAM UM COMPLEXO QUE MODULA A EXPRESSÃO DE GENES-ALVO

Visto que NAC1 não possui o motivo ZF de ligação ao DNA característico das proteínas da família BTB/POZ, sua capacidade de modular a expressão de seus genes-alvo depende da sua interação com outros co-fatores capazes de se ligar ao DNA, formando complexos transcricionais de maior magnitude (STEAD; CARR; WRIGHT, 2009). Para a identificação de moléculas potencialmente capazes de interagir com NAC1 em complexos reguladores da transcrição, buscou-se, através de análise *in silico*, por sítios de ligação de fatores de transcrição da família BTB/POZ nas regiões promotoras dos genes regulados por NAC1 previamente identificados por nosso grupo (GAO et al., 2014b). Identificou-se que muitos dos genes regulados por NAC1, inclusive *FOXQ1*, um alvo direto de regulação por NAC1 (GAO et al., 2014b), possuem, em suas regiões promotoras, a sequência consenso de ligação a BCL6 (dados não mostrados).

Em relação a *FOXQ1*, identificaram-se três motivos putativos de ligação a BCL6 em sua região promotora, denominados A, B e C, os quais se localizam próximos às posições -1000, -800 e -150 nucleotídeos a contar do sítio de início de transcrição, respectivamente (Figura 8a). A fim de determinar se BCL6, de fato, liga-se a esses três motivos consenso identificados no promotor de *FOXQ1*, realizaram-se ensaios de Ch-IP usando linhagens celulares, HeLa e MCF7, que expressam altos níveis de NAC1 (GAO et al., 2014b; YAP et al., 2012; ZHANG et al., 2012b). Fragmentos de cromatina associados a BCL6 foram imunoprecipitados com um anticorpo policlonal anti-BCL6 produzido em coelho, mas não com o controle isotópico. Para confirmar se os fragmentos de DNA imunoprecipitados pelo anticorpo anti-BCL6 continham os

motivos de BCL6 putativos localizados na região promotora de *FOXQ1*, ensaios de qPCR usando três pares de *primers* flanqueando os motivos candidatos A (-1000 a 0), B (-800 a 0) e C (-150 a 0) foram realizados. Cada par de *primer* amplificou seletivamente o motivo esperado a partir do imunoprecipitado de cromatina de BCL6 e não a partir do imunoprecipitado controle, com $P \leq 0,001$ para todos os três motivos (Figura 8b), indicando que a expressão de *FOXQ1* é provavelmente modulada por BCL6. Sendo assim, considerou-se que BCL6 é um co-fator candidato em complexos transcrpcionais que contêm NAC1 no CAO.V.

Em seguida, avaliou-se se NAC1 liga-se a BCL6 para formar complexos transcrpcionais que regulam os genes-alvo de NAC1, como *FOXQ1*. Para tal, células da linhagem HEK293T foram transfectadas com construtos contendo as regiões codificadoras de BCL6 em fusão com FLAG (BCL6-FLAG) e NAC1 selvagem em fusão com V5 (NAC1-V5), ou cada um dos cinco mutantes de deleção de NAC1 também em fusão com V5 (Figura 9a). Em seguida, ensaios de Co-IP de células co-transfectadas com BCL6-FLAG e NAC1-V5 foram realizados, indicando que ambas interagem diretamente entre si (Figura 9b). A fim de identificar o domínio de NAC1 necessário para mediar essa interação, fez-se a co-transfecção de células HEK293T com BCL6-FLAG e com cada um dos cinco fragmentos de NAC1: N130, M147, M171, C186 e C250. Enquanto os três primeiros fragmentos falharam em imunoprecipitar BCL6-FLAG, observou-se que C186 e C250, os quais abrangem os 185 e 250 aminoácidos localizados na porção C-terminal de NAC1, respectivamente, foram co-imunoprecipitados com BCL6-FLAG, indicando que a porção C-terminal de NAC1 é suficiente para promover a interação de NAC1 e BCL6 (Figura 9c). Interessantemente, ambos os fragmentos contêm o domínio BEN, um módulo alfa-hélice que medeia interações proteína-DNA e proteína-proteína durante

a organização de cromatina e a transcrição (ABHIMAN; IYER; ARAVIND, 2008). Esses dados indicam que o domínio BEN C-terminal de NAC1 medeia a interação de NAC1 e BCL6 para a formação de complexos regulatórios transcricionais que, possivelmente, ligam-se a regiões específicas nos promotores de genes-alvo de NAC1.

Para determinarmos a necessidade de NAC1 funcional no complexo NAC1/BCL6 putativo, analisou-se a transcrição de *FOXQ1* por qPCR em células HeLa N130 tTA. Essas células expressam NAC1 selvagem quando cultivadas na presença de doxociclina (sistema *off*), mas expressam a forma truncada e não funcional de NAC1, N130, a qual liga-se inativando NAC1 endógeno, quando cultivado na ausência de doxociclina (sistema *on*) (NAKAYAMA et al., 2006). Verificamos que, quando o sistema estava *off* (presença de doxociclina), BCL6 foi capaz de ligar-se aos seus motivos localizados no promotor de *FOXQ1*, mas quando o sistema estava *on* (ausência de doxociclina), a indução da expressão de N130 (levando à perda de função de NAC1) resultou em diminuição significativa ($P \leq 0,001$) da abundância de BCL6 imunoprecipitado com os três motivos de ligação a BCL6 no promotor de *FOXQ1*, A (-1000 a 0), B (-800 a 0) e C (-150 a 0) (Figura 10a). A fim de melhor entender a contribuição de NAC1 e BCL6 na expressão de *FOXQ1*, ensaios de atividade do promotor de *FOXQ1* utilizando-se o gene repórter Luciferase em células HeLa, nas quais a expressão de NAC1 e BCL6 foi silenciada por meio do uso siRNA, foram realizados. Verificou-se que a atividade do promotor de *FOXQ1* foi significativamente reduzida ($p \leq 0,001$) quando a expressão de NAC1, BCL6, ou ambos foi silenciada (Figura 10b). As eficiências de silenciamento de *NACC1* e *BCL6*, bem como a expressão de *FOXQ1* em respostas a esses é apresentada na Figura 10c. Esses dados sugerem um mecanismo através do qual NAC1 e BCL6

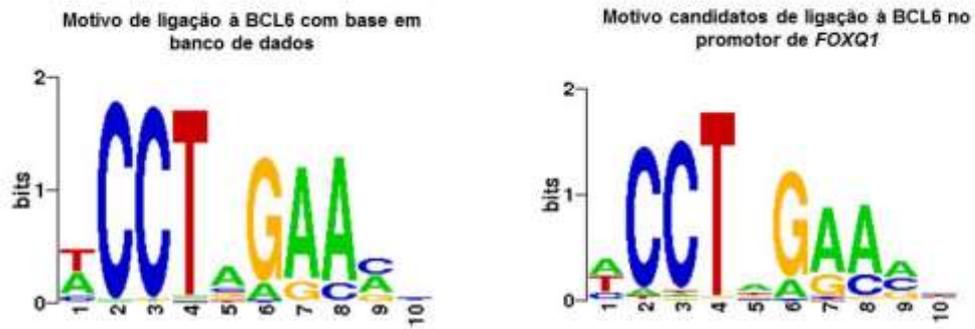
interagem e colaboram na regulação da atividade transcricional de genes no CAOv, a exemplo de *FOXQ1*.

De forma geral, esse conjunto de experimentos mostrou que NAC1 e BCL6 interagem formando um complexo transcricional que regula a expressão de genes-alvo. A interação de NAC1 e BCL6 já foi descrita em células neuronais e não neuronais através de ensaios de duplo-híbrido; contudo, neste trabalho, o complexo NAC1/BCL6 formado foi descrito como repressor da transcrição (KORUTLA et al., 2009). No presente estudo, não somente identificou-se a região exata de NAC1 que promove a interação com BCL6, mas caracterizou-se um mecanismo de ativação da transcrição de genes-alvo, aqui representado por *FOXQ1*.

6.2. NAC1 E BCL6 SÃO SUPEREXPRESSOS NO CAOv

A superexpressão de NAC1 já foi descrita no CAOv (NAKAYAMA et al., 2010). Da mesma forma, recentemente, foi descrito que BCL6 é superexpresso no CAOv, onde é um marcador prognóstico negativo da doença, promovendo a proliferação, migração e invasão dessas células (WANG et al., 2015). Nosso achado de que NAC1 e BCL6 ativam a transcrição de *FOXQ1* por um mecanismo cooperativo positivo sugere que essas moléculas podem ser reguladas de forma coordenada no CAOv.

a



b

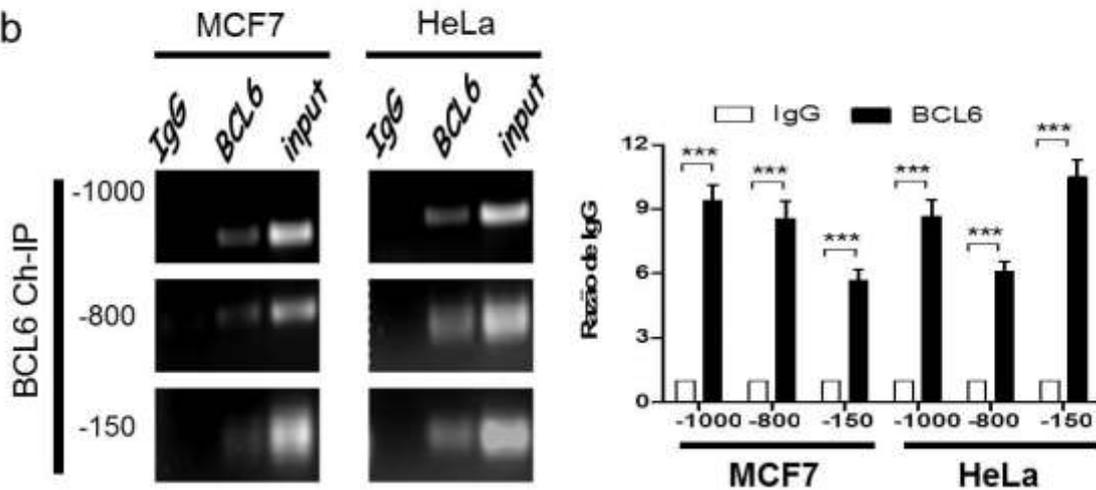


Figura 8 - O promotor de *FOXQ1* possui três motivos de ligação a BCL6. (a) Análise da sequência promotora de *FOXQ1* identificou três domínios putativos de ligação à BCL6 localizados nas posições -1000 a 0, -800 a 0 e -150 a 0, denominados A, B e C, respectivamente. (b) Ch-IP dos três domínios de BCL6 no promotor de *FOXQ1* resultou em amplicons do tamanho esperado (painel superior), os quais estavam enriquecidos no imunoprecipitado com anti-BCL6 quando comparados àquele com o controle isotópico IgG (painel inferior). ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni foi realizada. *** indica $P \leq 0,001$.

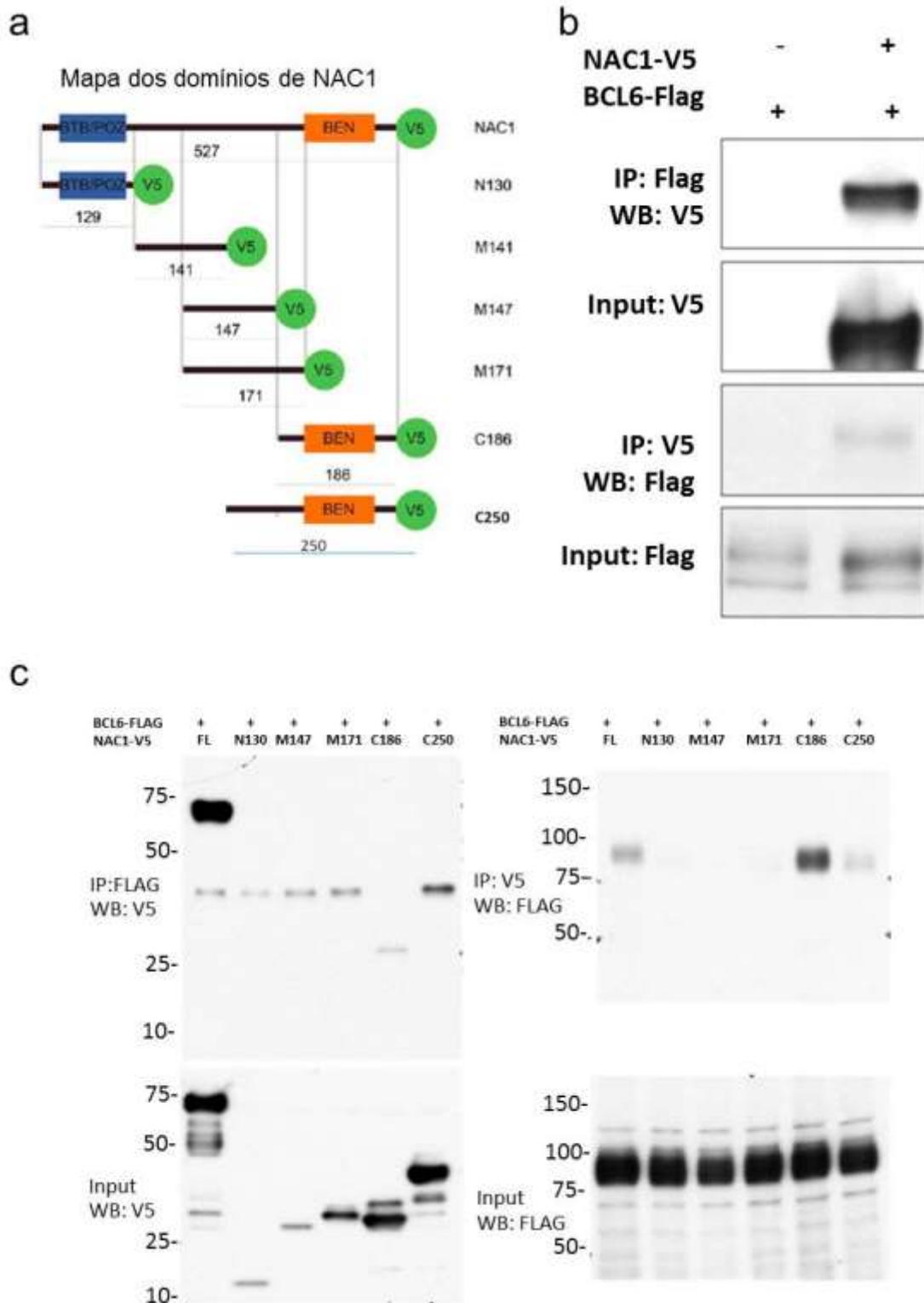


Figura 9 - Análise da interação entre NAC1 e BCL6 por Co-IP. (a) Representação dos domínios de NAC1 correspondendo aos diferentes construtos parciais de NAC1 utilizados. (b) Células da linhagem HEK293T foram transfectadas com os construtos NAC1-V5 e BCL6-FLAG e os lisados foram coletados para experimentos Co-IP. (c) Co-IP de NAC1 selvagem e dos mutantes de deleção NAC1-N130, NAC1-M147, NAC1-M171, NAC1-C186 e C-250 com BCL6-FLAG.

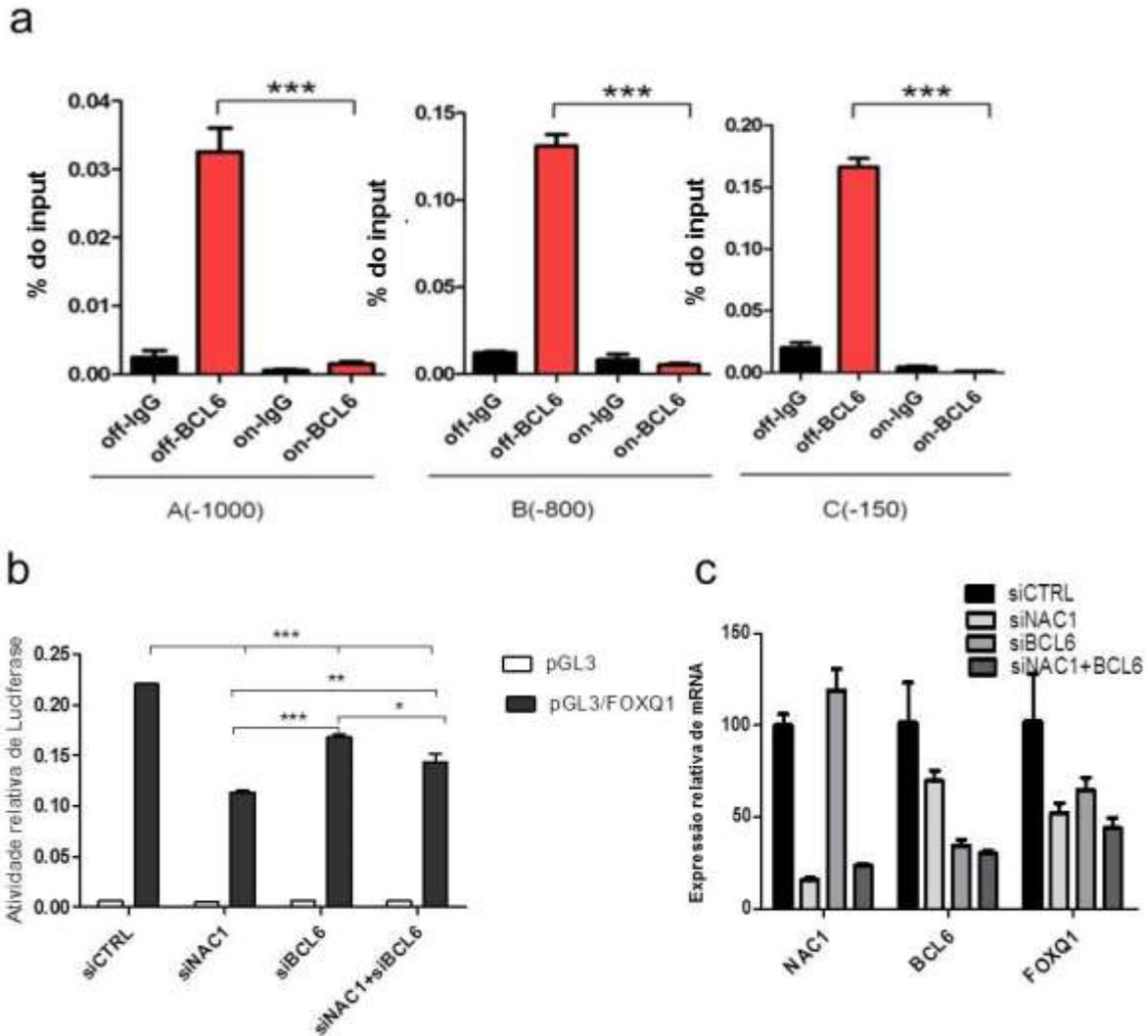


Figura 10 - BCL6 ativa a transcrição de *FOXQ1* de forma dependente de NAC1. (a) Ch-IP de BCL6 em células HeLa tTA expressando NAC1 endógeno (*off*) e, após a sua inativação, pela forma truncada N130 (*on*). (b) Ensaio de gene repórter Luciferase para verificar a atividade promotora de *FOXQ1* em células HeLa transfectadas com siNAC1 e/ou siBCL6. (c) Expressão de *NAC1*, *BCL6* e *FOXQ1* analisada por qPCR, indicando a eficiência de silenciamento dos alvos. ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$.

Para testar essa hipótese, analisou-se a expressão dos transcritos de *NACC1* e *BCL6* em um painel de sete linhagens de CAO, bem como a expressão proteica de *NAC1* e *BCL6* em 51 amostras de HGSC. Uma forte correlação entre a expressão de *NACC1* e *BCL6* foi verificada nas linhagens celulares testadas ($R^2=0,7025$; $P=0,0185$) (Figura 11a, b). A expressão proteica de *NAC1* e *BCL6* seguiu um padrão similar ($R^2= 0,31$; $P=0,027$) (Figura 11c, d). Esses resultados indicam que a superexpressão de *NAC1* e *BCL6* no CAO ocorre de forma coordenada, sugerindo um importante papel para o complexo *NAC1/BCL6* na carcinogênese/progressão do CAO. Os fenótipos similares observados por células, expressando tanto *NAC1* como *BCL6*, sugerem que o complexo *NAC1/BCL6* é responsável pela promoção do desenvolvimento tumoral ovariano. De fato, a superexpressão de *NAC1* ou *BCL6* foi relacionada à diminuição do tempo de vida livre de doença (NAKAYAMA et al., 2010; WANG et al., 2015b).

6.3. *NAC1* ATENUA A AUTORREGULAÇÃO NEGATIVA DE *BCL6*

Com base nos dados anteriores que mostraram uma correlação positiva, entre a expressão de *NAC1* e *BCL6* no CAO, e sabendo que já foi descrita a participação de outros membros da família BTB/POZ (CtBP e PATZ) no processo de autorregulação negativa de *BCL6* (MENDEZ et al., 2008; PERO et al., 2012), buscou-se verificar se *NAC1* também contribui para a regulação da expressão de *BCL6*.

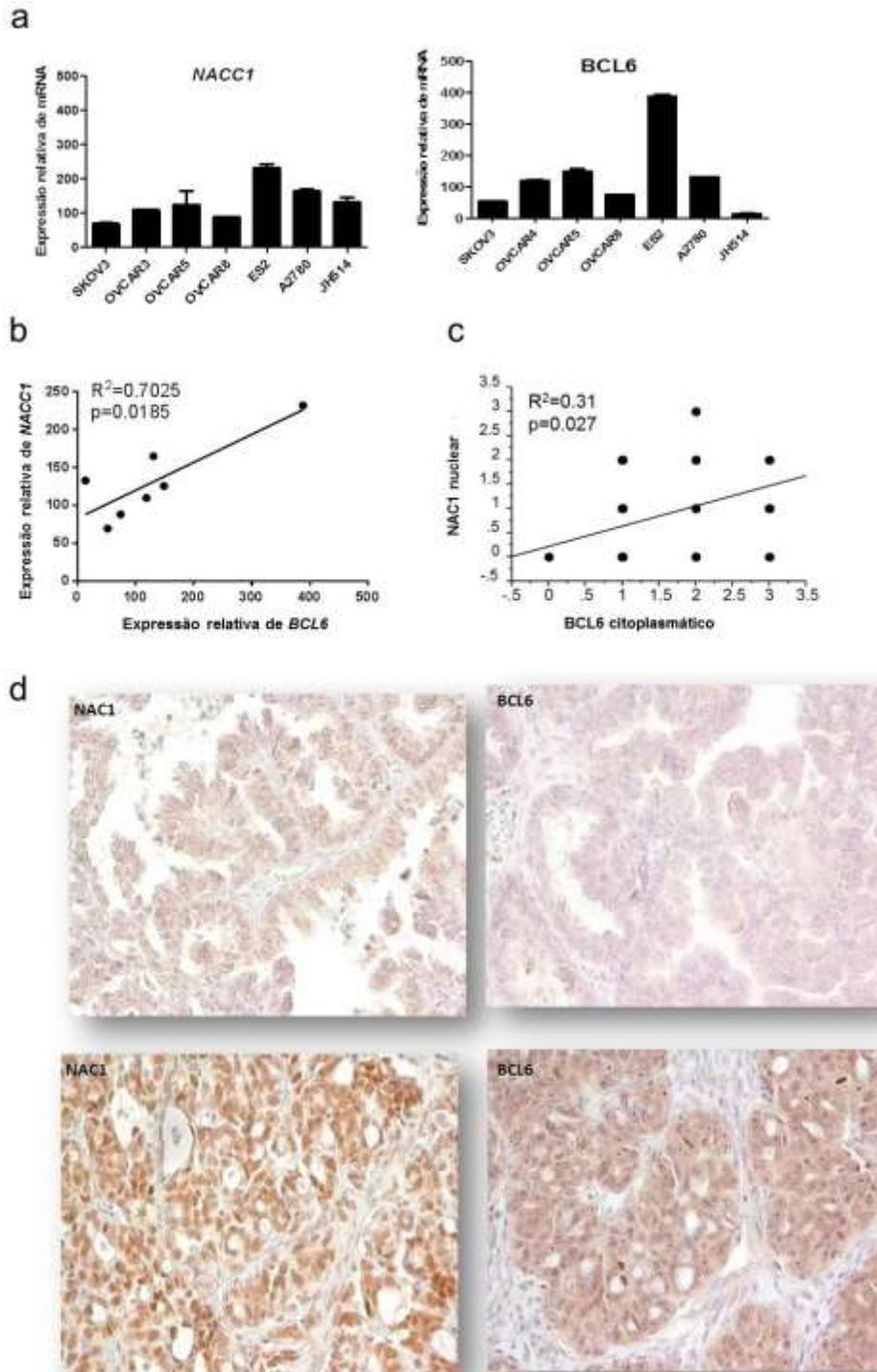


Figura 11 - Coexpressão de NAC1 e BCL6 no CAOV. (a) Ensaio de qPCR foram realizados em um painel de sete linhagens celulares derivadas de CAOV para detecção da expressão de *NACC1* e *BCL6*. (b) Regressão linear mostrando a correlação positiva entre a expressão de *BCL6* e *NACC1* em linhagens celulares de CAOV. (c) Regressão linear mostrando a correlação positiva entre a expressão de NAC1 e BCL6 em HGSC. (d) Análise imunoistoquímica da expressão proteica de NAC1 e BCL6 em HGSC (n=51). Os valores de R^2 e P são indicados nos gráficos.

Dessa forma, inicialmente estudou-se o efeito da modulação da expressão de NAC1 na transcrição de *BCL6*. Quando NAC1 foi expresso ectopicamente em células da linhagem OSE4, verificou-se o aumento da transcrição de *BCL6* ($P=0,0412$) (Figura 12a). Inversamente, quando NAC1 foi silenciado pelo uso de siNAC1, houve a diminuição da expressão de *BCL6* nas células OVCAR-3 ($P=0,0089$), OVACR-5 ($P=0,0160$), SKOV3 ($P=0,0216$) e SKOV3^{TR} ($P=0,0002$) (Figura 12b-f). As eficiências de transfecção estão expostas na Figura 13. Corroborando esses dados, mostrou-se que há, no baço de camundongos *Nacc1*^{-/-}, uma redução de aproximadamente 50% nos níveis do transcrito *BCL6* ($P=0,0004$) (Figura 13g). Em seguida, realizou-se Ch-IP de NAC1 e BCL6 endógenos no motivo de autorregulação de *BCL6* na linhagem OVCAR-3 (Figura 14). Dessa maneira, demonstrou que NAC1, não somente liga-se ao promotor de *BCL6* ($P\leq 0,001$) no seu domínio de autorregulação, mas que essa ligação depende do próprio BCL6, como demonstrado pela diminuição da expressão de BCL6 observada no ensaio de competição em que o domínio mínimo de ligação a BCL6 de NAC1, NAC1-C186, foi expresso ectopicamente ($P\leq 0,001$) (Figura 14c). Conjuntamente, esses resultados trazem evidências de que NAC1 regula a transcrição de *BCL6* ao interagir com a proteína BCL6. Entretanto, NAC1 tem um efeito ativador no promotor de *BCL6*, ao oposto dos mecanismos de autorregulação negativa de BCL6 já descritos. Sendo assim, para o nosso conhecimento, essa é a primeira vez que tal mecanismo celular, por meio do qual um membro da família POZ/BTB age juntamente com BCL6, liberando-o de sua autorrepressão, foi descrito.

6.4. IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS ALVOS REGULATÓRIOS DO COMPLEXO NAC1/BCL6

Com o intuito de identificar possíveis novos alvos regulatórios do complexo NAC1/BCL6, células da linhagem OVCAR-5 foram transfectadas com siNAC1,

siBCL6, ou como um RNA de interferência controle, siCTRL. A expressão gênica dos alvos de *NACC1* e *BCL6* foi avaliada 72h após as transfecções por qPCR e verificou-se a eficiência de silenciamento (Figura 15a). Identificou-se, por intermédio da análise de microarranjo de cDNA, que 238 genes são regulados positivamente por NAC1, 188 por BCL6 e 54 por ambos. Dentre os genes regulados negativamente pelos fatores de interesse, encontraram-se 139 por NAC1, 113 por BCL6 e 25 por ambos (Figura 15b). A análise de vias de sinalização, apresentada em mapas *tile*, nos possibilitou verificar que o silenciamento de ambos *NACC1* e *BCL6* resulta predominantemente na diminuição na expressão de genes-alvo, sobretudo nas categorias funcionais de movimento celular, desenvolvimento e função de sistema hematológico, tráfego de células imunes, resposta inflamatória e crescimento e proliferação celular. Por outro lado, apenas genes classificados em funções relacionadas à morte e à sobrevivência celular tiveram sua expressão aumentada em resposta ao silenciamento tanto de NAC1 quanto de BCL6 (Figura 15c-d). Ainda, a análise das vias de sinalização afetadas por NAC1 e BCL6 também revelou a regulação positiva de vias de sinalização nas quais participam IL-17, IL-8, IL-6 e CXCL2 (Tabela 2), dentre outras, as quais, apesar de não serem vias de sinalização profundamente dissecadas no câncer, vêm ganhando notoriedade na pesquisa oncológica, dadas suas funções, promovendo o crescimento tumoral e o fenótipo de CSC (CHANG et al., 2011; CHIN; WANG, 2014; INFANGER et al., 2013). As dez primeiras categorias funcionais de acordo com o $-\log(p \text{ valor})$ da análise IPA reguladas negativamente por NAC1 e BCL6 são mostrada na Tabela 3.

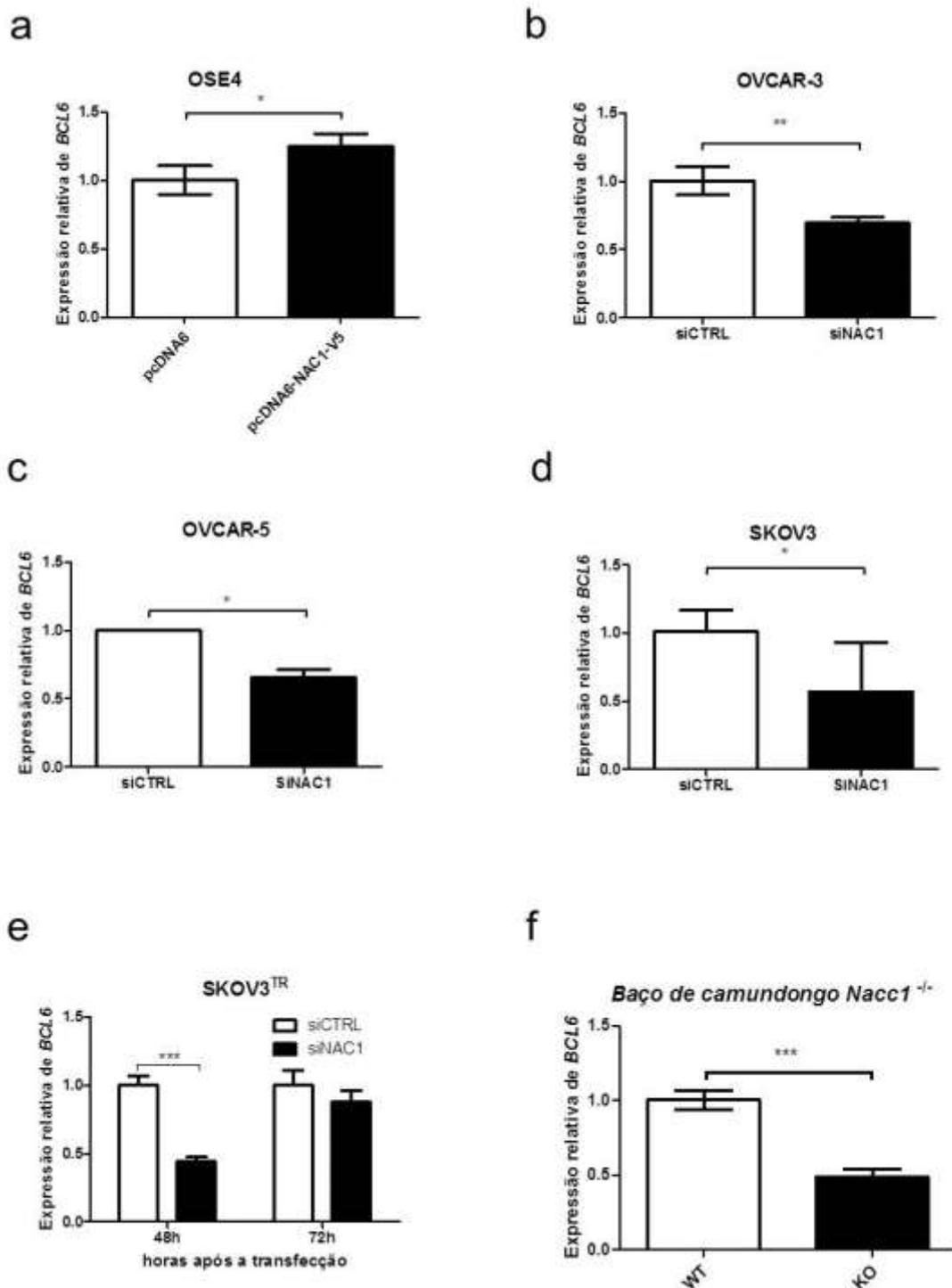


Figura 12 - NAC1 modula a expressão de BCL6. (a) Células OSE4 foram transfectadas com o construto pcDNA6/NAC1-V5 e qPCR foi realizado 48h após a transfecção indicando o aumento da transcrição de *BCL6*. RNA de interferência para NAC1 (siNAC1) foi transfectado em células (b) OVCAR-3, (c) OVCAR-5, (d) SKOV3 e a expressão de *BCL6* foi avaliada em 72h por qPCR. (e) Células da linhagem resistente ao taxol SKOV3^{TR} foram transfectadas com siNAC1 e a expressão de *BCL6* foi analisada 48h e 72h após, por qPCR. (f) A expressão de mRNA de *BCL6* foi avaliada por qPCR em células do baço de camundongos *Nacc1*^{-/-}. Teste T de uma via não pareado foi realizado. * indica $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

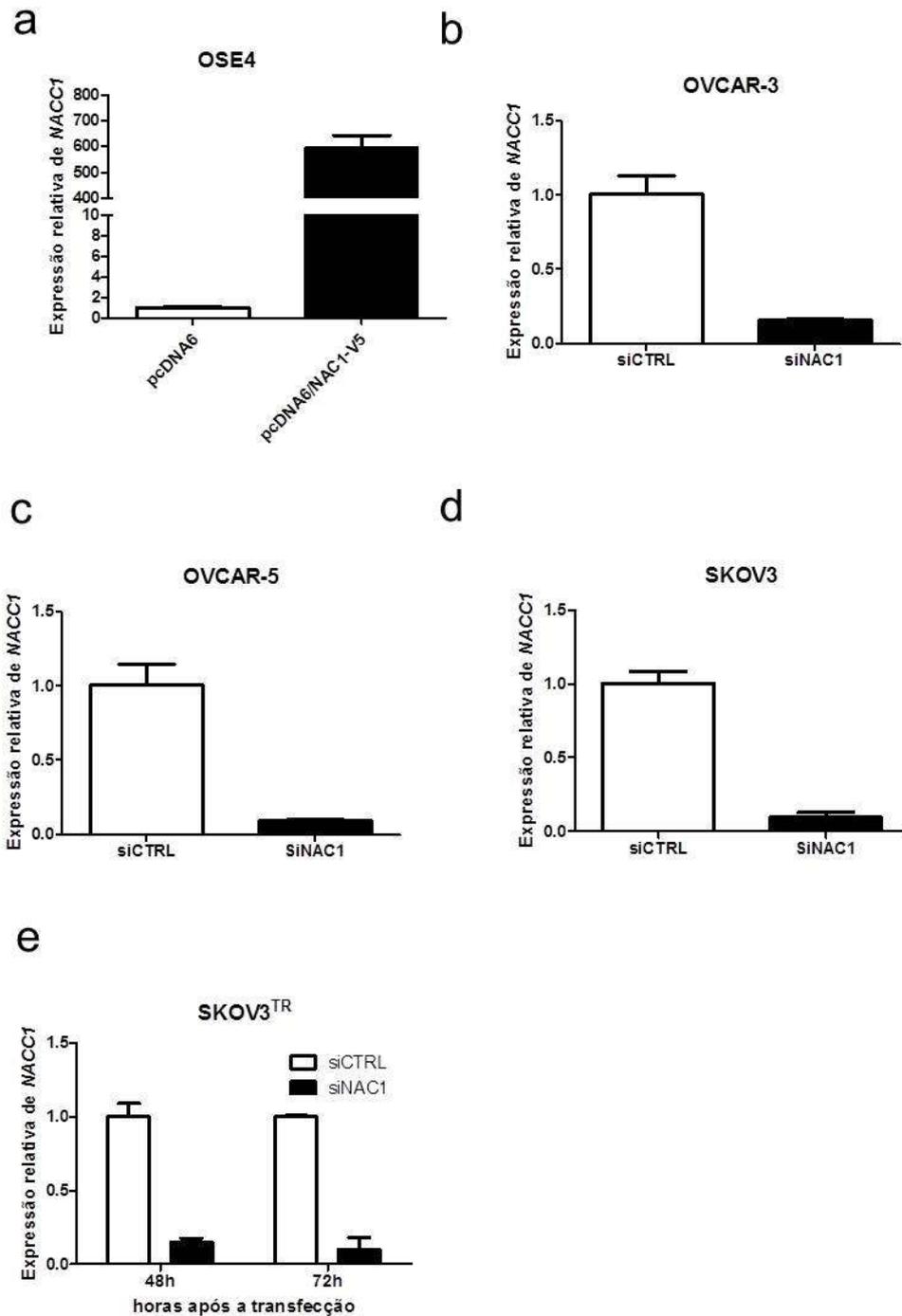


Figura 13 – Eficiência de transfecção dos experimentos apresentados na Figura 12. A expressão de *NACC1* foi avaliada por qPCR após expressão ectópica ou silenciamento gênico, mediado por siRNA, de *NACC1*. (a) Expressão de *NACC1* em células OSE4 48h após transfecção de pcDNA6/NAC1-V5. Expressão de *NACC1* 72h após transfecção de siNAC1 ou do controle negativo siCTRL em células das linhagens (b) OVCAR-3, (c) OVCAR-5, (d) SKOV3. (e) Expressão de *NACC1* 48 e 72h após transfecção de siNAC1 ou siCTRL em células da linhagem resistente a taxol SKOV3^{TR}.

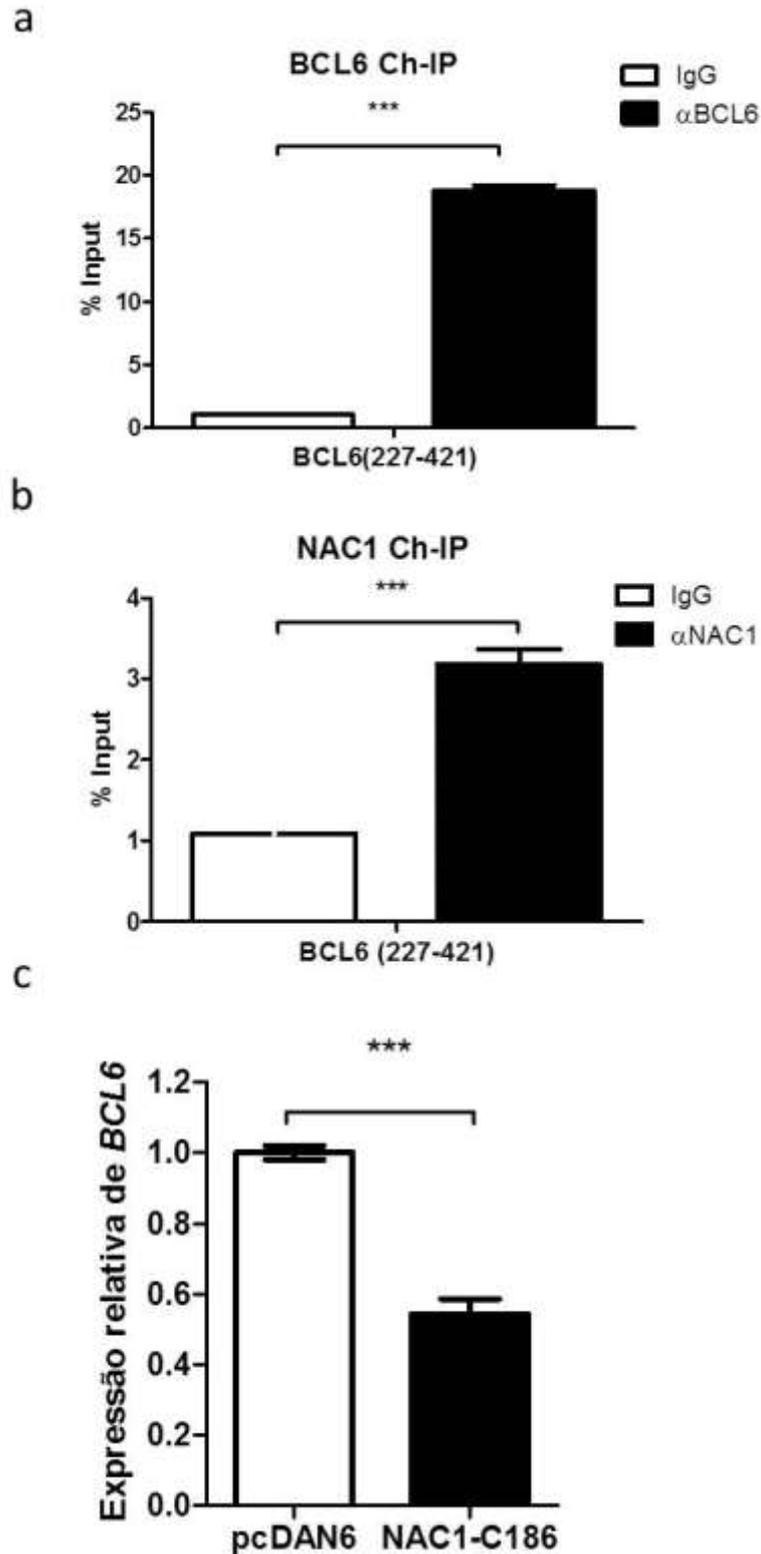


Figura 14 - Ligação de NAC1 ao promotor de *BCL6* é necessária para prevenir sua autorregulação negativa. Ch-IP de (a) *BCL6* e (b) *NAC1* em células OVCAR-3. (c) Ensaio de competição mostrando que *BCL6* tem sua expressão reduzida 48h após a transfecção, em células OVCAR-3, do domínio mínimo de ligação a *BCL6* de *NAC1*, *NAC1-C186*. Teste T de uma via não pareado. *** indica $p \leq 0,001$.

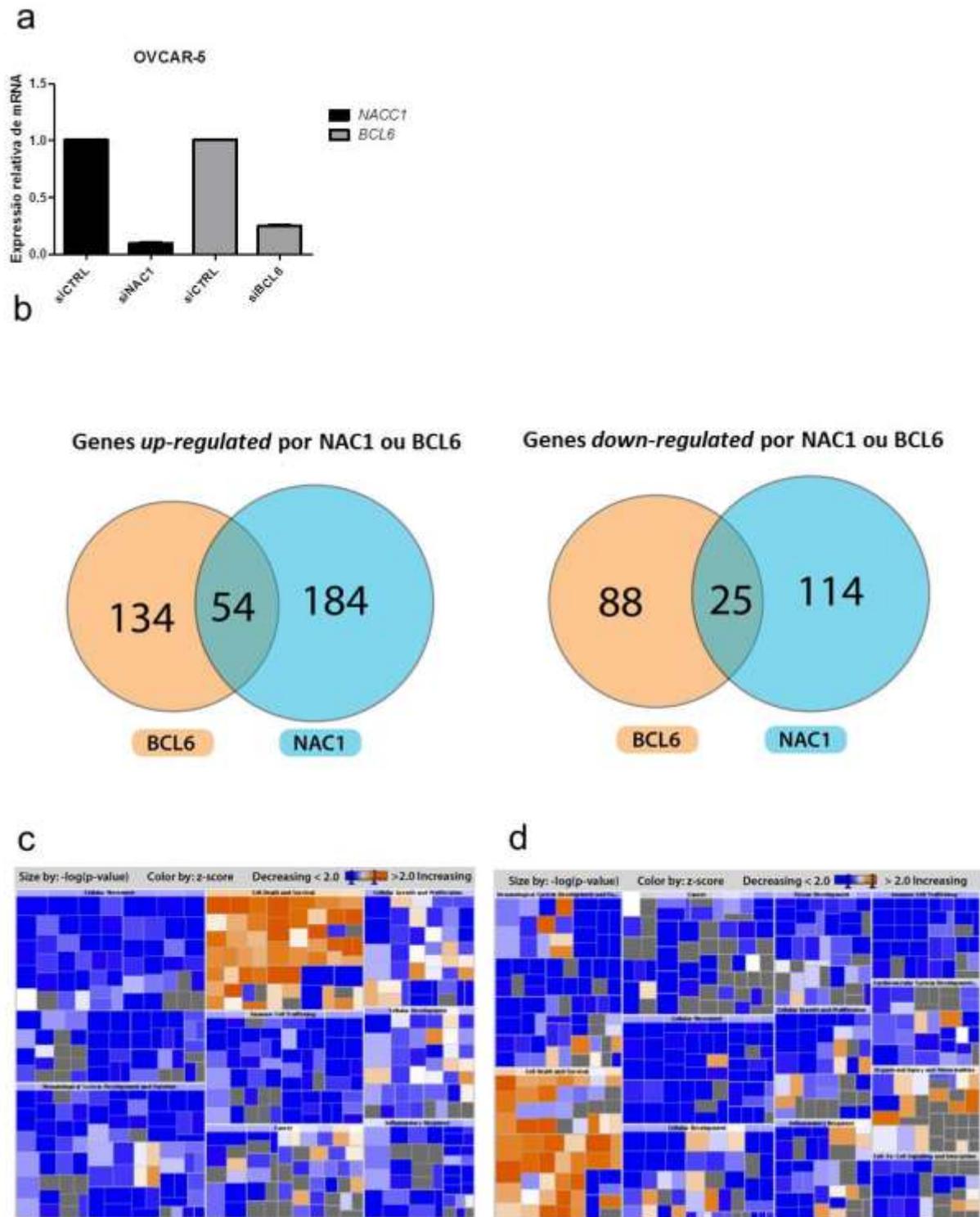


Figura 15 - Identificação de novos alvos regulatórios do complexo NACC1/BCL6. (a) Células da linhagem OVCAR-5 tiveram *NACC1* e *BCL6* silenciados por siNACC1 e siBCL6, respectivamente. Após 72h a eficiência dos silenciamentos foi analisada, através de qPCR, em relação a siCTRL. (b) Diagramas de Venn mostrando o número de genes que tiveram sua expressão alterada (*up*-, ou *down-regulated*) pelo silenciamento de *NACC1*, *BCL6*, ou ambos. Análise de vias dos genes afetados pelo silenciamento de (c) *NACC1* ou (d) *BCL6*. Mapas *tile* mostram tendências previstas das categorias de funções biológicas mais significativamente associadas. Cada quadrado no mapa representa uma função biológica específica e funções biológicas relacionadas são agrupadas em categorias maiores. O tamanho dos quadrados reflete o $-\log(P \text{ valor})$ das funções biológicas, com tamanhos \rightarrow

Tabela 2 - Dez primeiras categorias funcionais de acordo com o $-\log(p \text{ valor})$ da análise IPA reguladas positivamente por NAC1 e BCL6.

<i>Ingenuity Canonical Pathways</i>	$-\log(P \text{ valor})$	Razão	Moléculas
Sinalização de IL17	4,67E00	5,41E-02	<i>IL8,MMP3,PTGS2,IL6</i>
Adesão e diapedese de granulócitos	3,29E00	2,25E-02	<i>IL8,MMP3,CLDN1, CXCL2</i>
Adesão e diapedese de agranulócitos	3,19E00	2,12E-02	<i>IL8,MMP3,CLDN1, CXCL2</i>
Hematopoiese a partir de células tronco pluripotentes	2,67E00	3,17E-02	<i>IL8,IL6</i>
Sinalização de aterosclerose	2,6E00	2,19E-02	<i>IL8,MMP3,IL6</i>
Fibrose hepática/ Ativação de células hepáticas estreladas	2,43E00	2,05E-02	<i>IL8,IGFBP5,IL6</i>
Papel de hipercitocinemia/hiperquimiocinemia na patogênese de influenza	2,4E00	4,55E-02	<i>IL8,IL6</i>
Papel de Il-17 em doenças inflamatórias alérgicas das vias aéreas	2,4E00	4,17E-02	<i>IL8,IL6</i>
Papel de citocinas mediando a comunicação entre células imunes	2,2E00	3,64E-02	<i>IL8,IL6</i>
Sinalização de fase aguda	2,19E00	1,67E-02	<i>SOD2,CFB,IL6</i>

→ maiores indicando maior significância estatística. A cor dos quadrados é graduada de laranja a azul, sendo laranja indicativa de um valor Z-score positivo (função biológica predita aumentada) e azul, valor Z-score negativo. As funções biológicas para as quais não foi possível prever uma direção baseada na base de dados *Ingenuity Knowledge Base* atual são mostrados em cinza.

Tabela 3 - Dez primeiras categorias funcionais de acordo com o $-\log(p \text{ valor})$ da análise IPA reguladas negativamente por NAC1 e BCL6.

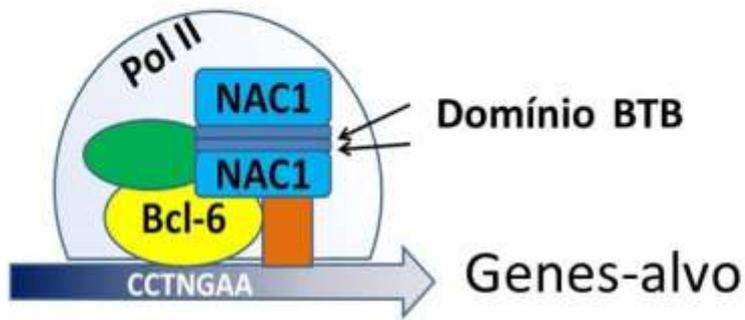
<i>Ingenuity Canonical Pathways</i>	$-\log(P \text{ valor})$	Razão	Moléculas
Biossíntese de glicina	2,67E00	1,67E-01	<i>SHMT1</i>
Síntese de novo de dTMP	2,27E00	7,14E-02	<i>SHMT1</i>
Poliglutamilação de folato	2,27E00	5,56E-02	<i>SHMT1</i>
<i>Superpathway</i> de biossíntese de serina e glicina	2,19E00	5,56E-02	<i>SHMT1</i>
Síntese de inositol pirofosfatos	2,12E00	6,25E-02	<i>IP6K3</i>
Transformações de folato I	2,01E00	3,12E-02	<i>SHMT1</i>
Degradação de glicina-betaína	1,97E00	4,35E-02	<i>SHMT1</i>
Ciclo do TCA II (Eucariótico)	1,61E00	2,44E-02	<i>SDHD</i>
Sinalização de quimiocinas	1,15E00	1,37E-02	<i>MPRIP</i>
Regulação de motilidade baseada em actina por Rho	1,07E00	1,12E-02	<i>MPRIP</i>

7. CONCLUSÕES

Conforme dados apresentados neste capítulo propomos dois modelos através dos quais NAC1 participa da regulação da expressão gênica. No primeiro, propomos que NAC1 e BCL6 formem um complexo, ao interagirem através do domínio BEN C-terminal de NAC1. Este complexo, por sua vez, liga-se aos promotores dos genes-alvo através de motivos de ligação à BCL6, ativando a sua transcrição (Figura 16a). Através do segundo modelo, propomos um mecanismo através do qual NAC1 atenua a autorregulação negativa de BCL6 (Figura 16b), ao interagir com BCL6 no motivo de autorregulação do gene *BCL6*, promovendo o deslocamento dos correpressores de BCL6, liberando-o da sua auto-repressão.

Desta forma, os resultados apresentados neste capítulo trazem implicações biológicas e translacionais substanciais. Demonstramos um novo mecanismo celular por meio do qual NAC1 age como um gene fundamental para a progressão de CAOV. Nossa observação de que NAC1 promove a progressão tumoral, ao menos em parte, pela interação com BCL6 aprofunda nosso conhecimento dos mecanismos complexos que formam a igualmente complexa e ampla rede transcricional regulatória no câncer, trazendo novas perspectivas para o tratamento do CAOV com o emprego de estratégias que tenham como alvo o complexo NAC1/BCL6.

a



b

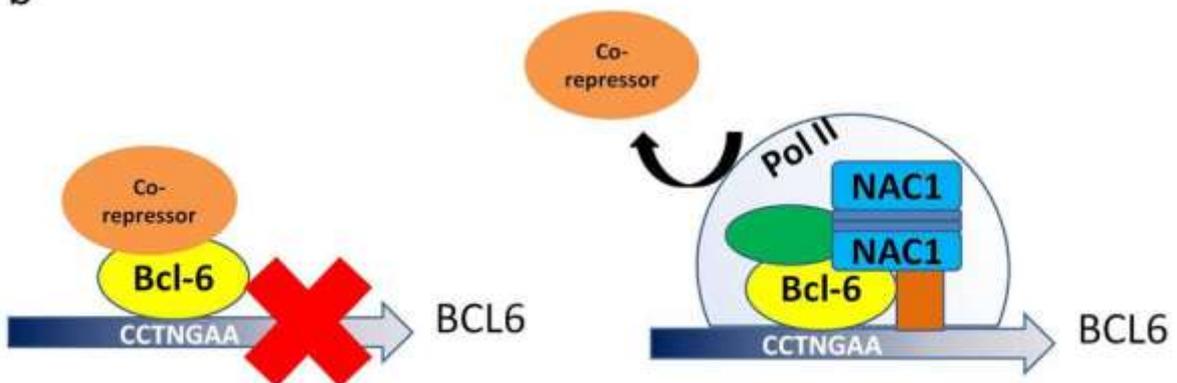


Figura 16 - Modelos propostos para o papel de NAC1 na regulação da expressão gênica. (a) NAC1 e BCL6 interagem através do domínio BEN de NAC1 formando um complexo que se liga aos promotores dos genes-alvo através de motivos de ligação à BCL6, ativando a transcrição desses genes. (b) NAC1 interage com BCL6 ligado ao seu motivo de auto-regulação negativa impedindo a interação de BCL6 com seus repressores, atenuando a sua auto-repressão.

**CAPÍTULO 2: EFEITO DA CISPLATINA NO FENÓTIPO DE
CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MIGRAÇÃO E
QUIMIORRESISTÊNCIA.**

8. INTRODUÇÃO

Conforme mencionado, diversos fatores podem levar ao aumento da resistência do tumor à quimioterapia. Dentre esses, podemos citar as CSC e o microambiente tumoral.

As CSC compõem uma subpopulação relativamente pequena de células, as quais integram a massa heterogênea dos tumores sólidos e apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação em células da massa tumoral (ALISON; LIM; NICHOLSON, 2011; KONG et al., 2011). Além disso, as CSC apresentam marcada quimiorresistência, sendo cruciais ao desenvolvimento, à recidiva e à metástase tumoral (KONG et al., 2011; NIERO et al., 2014). Essas células são caracterizadas, também, pelo padrão de expressão de proteínas de superfície celular, de proteínas de citoesqueleto e de fatores de transcrição, muitos dos quais são encontrados em células indiferenciadas, como as células-tronco mesenquimais e embrionárias (BAPAT, 2010; LATIFI et al., 2011).

As CSC já foram identificadas no CAOv, onde, além de se auto renovarem e se diferenciarem (WICHA; LIU; DONTU, 2006), são capazes de crescer de forma independente de ancoragem, gerar novos tumores (são tumorigênicas) e apresentam alta mobilidade, conforme demonstrado em ensaios de esferas sobrenadantes, formação de colônia e migração, respectivamente (revisado por BAPAT, 2010), todas características importantes para a progressão tumoral.

Diversos marcadores que permitem a identificação de CSC vêm sendo propostos, sendo que esses geralmente correspondem a fatores de transcrição, proteínas de citoesqueleto e de membrana, cuja superexpressão está relacionada ao fenótipo indiferenciado das células referidas. Nesse contexto, temos como exemplos os

fatores de transcrição nanog (*NANOG*) e oct4 (*POU5F*), a proteína de citoesqueleto nestina (*NES*) e as moléculas de adesão de superfície celular CD44 e CD24 (revisado por BAPAT, 2010; revisado por GARSON; VANDERHYDEN, 2015). Em relação aos últimos, diversos trabalhos relatam que células que expressam CD44 (CD44+) e baixo ou nenhum CD24 (CD24-) têm características de CSC (AL-HAJJ et al., 2003; CALCAGNO et al., 2010; KUMAR et al., 2010; MENG et al., 2012; PONTI et al., 2005).

Conforme mencionado acima, a quimiorresistência configura característica importante das CSC, inclusive, podendo ser utilizada para a seleção de CSC no câncer de mama (CALCAGNO et al., 2010). O mesmo também foi descrito no CAOV. Primeiramente, Ma e colaboradores (2010) usaram cisplatina e paclitaxel, separadamente, para selecionar esferas sobrenadantes derivadas de células aderentes da linhagem de carcinoma de ovário SKOV3 (MA et al., 2010). As esferas isoladas apresentaram marcada resistência a múltiplas drogas (cisplatina, paclitaxel, adriamicina e metotrexato), além de apresentarem alta expressão de genes relacionados ao fenótipo indiferenciado, como *NES*, *NANOG*, *POU5F1*, *PROM1* e *ABCG2*, e da proteína de superfície CD117, a qual é frequentemente superexpressa em CSC; além de serem mais tumorigênicas. Outro estudo, publicado no ano seguinte, usou a linhagem celular OVCA433, bem como amostras frescas de tumores ovarianos avançados (derivadas do tumor sólido e do líquido ascítico), para demonstrar o papel da cisplatina em selecionar células com características de CSC (LATIFI et al., 2011). Após o tratamento das células por cinco dias consecutivos com cisplatina, as células resultantes apresentaram aumento da expressão de proteínas de superfície como CD44 e $\alpha 2$ integrina, bem como na transcrição dos fatores de transcrição *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *NANOG*, *POU5F1*, e da enzima MMP2.

Também foi demonstrado que, frente à exposição à cisplatina, as células apresentaram maior potencial migratório. Ainda, os autores foram capazes de demonstrar uma relação entre o aumento da população com características de CSC e alterações no perfil de expressão das moléculas de adesão E-caderina e N-caderina, de forma a sugerir a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelium-mesenchymal transition*) (discutido nos próximos parágrafos) como possível mecanismo de geração de CSC (revisado por KONG et al., 2011). Essa relação entre quimioterápicos e o enriquecimento da população de CSC fortalece a ideia do envolvimento das CSC com a quimiorresistência e, conseqüentemente, com a progressão e recidiva do CAOV. De fato, o simples conceito de que o tumor é composto por um grupo heterogêneo de células já traz consigo a ideia de que a resposta aos agentes quimioterápicos será distinta, levando à resistência à terapia.

Em relação à origem das CSC, a teoria é de que essas podem originar-se, de forma não excludente, de células-tronco mesenquimais, de células progenitoras ou de células diferenciadas que, devido a fatores ambientais, adquirem o fenótipo maligno (BJERKVIG et al., 2005) (Figura 17). Segundo Alison e colaboradores, a teoria de que as CSC que dariam origem a um novo tumor descenderem de células-tronco mesenquimais, ou de células progenitoras, parece lógica por duas razões: primeiramente, as células-tronco mesenquimais já possuem a característica de auto-renovação necessária à formação e manutenção da massa tumoral; segundo, em tecidos em constante renovação, como hematopoiético, pele e estômago, por exemplo, onde uma célula que deixa o nicho de célula-tronco é imediatamente direcionada para fora do sistema (meia-vida curta), não há tempo suficiente para que essas células acumulem o número de mutações necessárias para a

transformação maligna, sendo provável a origem a partir de células indiferenciadas, do ponto de vista prático (ALISON; LIM; NICHOLSON, 2011).

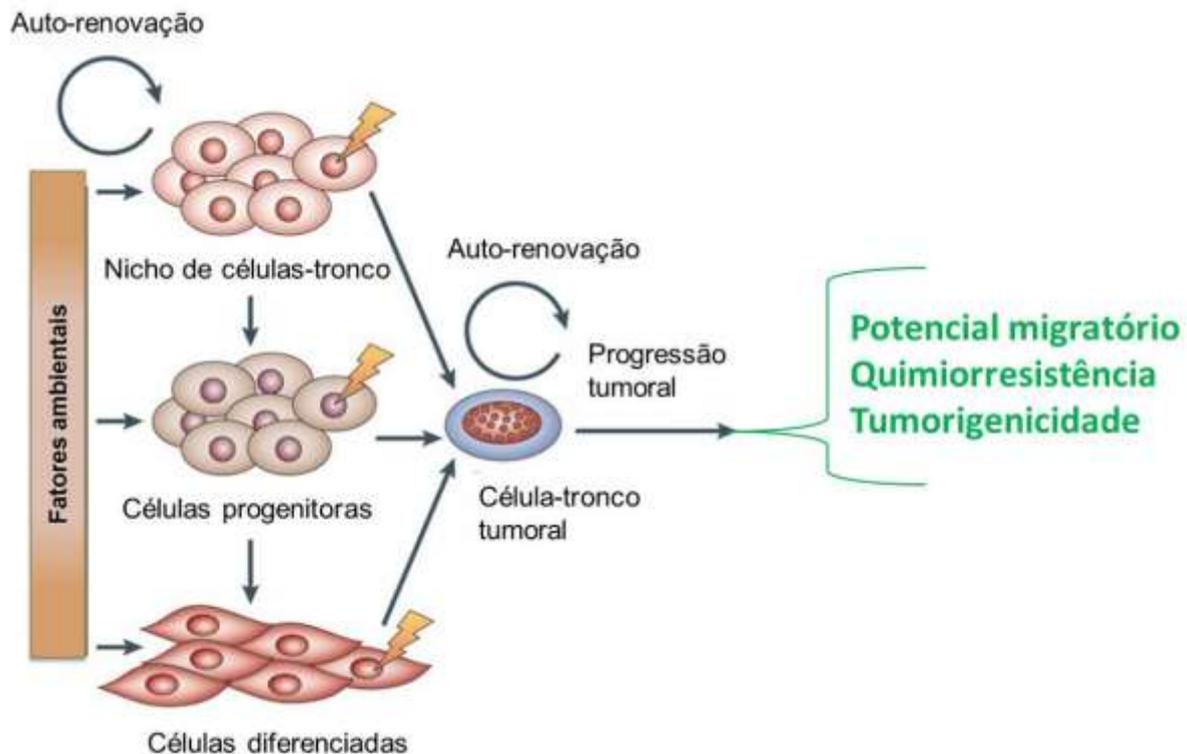


Figura 17 - Origem das CSC. As CSC podem originar-se de células-tronco normais, de células progenitoras ou de células diferenciadas que, ao sofrerem influência de fatores ambientais, adquirem o fenótipo maligno. Adaptado de BJERKVIG et al., 2005.

Em relação ao modelo de que as CSC seriam originadas de células desdiferenciadas, a EMT seria um mecanismo que poderia explicar tal processo. Através da EMT, células epiteliais polarizadas, que normalmente interagem com as suas membranas basais, passam por uma série de modificações bioquímicas que permitem que essas assumam um fenótipo de células mesenquimais, que incluem capacidade migratória, resistência à apoptose, e produção aumentada de componentes de matriz extracelular (KALLURI; NEILSON, 2003). Existem três tipos de EMT (tipo I, tipo II e tipo III) de acordo com a situação (fisiológica ou patológica) que a desencadeia (KALLURI; WEINBERG, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009). A

EMT tipo III ocorre em células neoplásicas que passaram por alterações genéticas e epigenéticas, especialmente em genes que favorecem o crescimento clonal e desenvolvimento de tumores localizados. Células de carcinoma que passam por EMT tipo III adquirem fenótipo invasivo e metastático. Além disso, diferentes células podem passar por diferentes níveis de EMT, mantendo características de células epiteliais e de células indiferenciadas (KALLURI; WEINBERG, 2009). Outro aspecto importante, em relação à ocorrência de EMT durante a progressão tumoral, é que células, que adquirem fenótipo invasivo e metastático no câncer, comumente produzem uma nova colônia, em um sítio distante, com características semelhantes às do tumor inicial. Para que isso ocorra, é necessário que essas células tumorais desdiferenciadas passem por um novo processo de diferenciação, chamado transição mesênquima-epitelial. Sendo assim, acredita-se que o nicho seja um fator fundamental nos processos que levam à EMT (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Nesse contexto, em relação aos mecanismos moleculares que levam à EMT, podemos citar a ação de fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral, os quais, já foi demonstrado, induzem ou ativam uma série de fatores de transcrição relacionados à EMT nas células tumorais, dentre os quais Snail, Slug, Zeb1, dentre outros. Dentre esses fatores de crescimento, destaca-se o TGF- β (OFT; HEIDER; BEUG, 1998). O mecanismo pelo qual a EMT é induzida por TGF- β depende de SMAD3/SMAD4 que, por sua vez, ativam a transcrição de genes de diferentes famílias de fatores de transcrição que promovem a aquisição do fenótipo indiferenciado. Dentre eles, podemos citar Zeb1, responsável pela supressão da expressão de E-caderina e promoção da expressão de N-caderina, alteração essa que é tida como um dos marcadores de EMT (XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). Apesar do efeito de TGF- β induzindo EMT, sabe-se que esse é capaz de induzir

migração de células de CAOV de forma independente de EMT (GAO et al., 2014a). Além disso, TGF- β apresenta um mecanismo dual no câncer (revisado por SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003) o qual está resumido na Figura 18. Em células com baixo potencial maligno TGF- β , tem efeito citostático. Num segundo momento, quando há perda da via de TGF- β ou da resposta citostática das células, TGF- β seleciona células com um padrão de proliferação mais agressivo, e, por fim, em células que mantêm a sinalização de TGF- β , mas não apresentam a resposta citostática, esse induz a migração, conforme mencionado anteriormente. TGF- β ainda tem efeitos promovendo a invasão das células tumorais, promovendo a metástase e regulando a resposta imunitária anti-tumoral, ao inibir linfócitos T citotóxicos (revisado por SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003).

Assim como o TGF- β , outras citocinas já foram descritas como potencialmente envolvidas na determinação do destino das CSC, dentre os quais podemos citar IL-6, IL-8 e CCL2 (revisado por CHIN; WANG, 2013). Paralelamente, CXCL1 e CXCL2 foram descritos como fatores que ligam a quimiorresistência à migração celular no câncer de mama (ACHARYYA et al., 2012). Nesse estudo, os autores mostraram que a expressão de CXCL1 e CXCL2 aumenta à medida que as células adquirem fenótipo maligno e metastático, bem como em resposta à doxorrubicina, em modelo murino de câncer de mama. Além disso, CXCL1 já foi descrita como um fator indutor da proliferação de células de CAOV por intermédio da ativação do receptor de fator de crescimento epidermal (BOLITHO et al., 2010). Ainda, CXCL2 é capaz de induzir a migração de células musculares lisas através da ativação do seu receptor CXCR2 (AL-ALWAN et al., 2013). Por fim, sabe-se que o bloqueio do receptor CXCR2 em modelo de câncer de mama aumenta a resposta terapêutica, diminui o crescimento tumoral e de metástases pulmonares (SHARMA et al., 2013). Dessa forma, há fortes

evidências do papel dessas quimiocinas na quimiorresistência e migração de células tumorais, indicando a relevância do estudo dessas vias no câncer. De fato, os membros da família CXC bem como seus receptores apresentam funções diversas no câncer (revisado por VANDERCAPPELLEN; VAN DAMME; STRUYF, 2008). Vias desencadeadas pelos receptores CXCR1, CXCR2 e CXCR4 têm efeito pró-tumoral, promovendo angiogênese, migração e metástase, além de regularem negativamente a resposta antitumoral. Por outro lado, vias que perpassam por CXCR3 têm efeito antitumoral, bloqueando a angiogênese e favorecendo a infiltração de linfócitos T citotóxicos e células NK para o sítio tumoral (Figura 19).

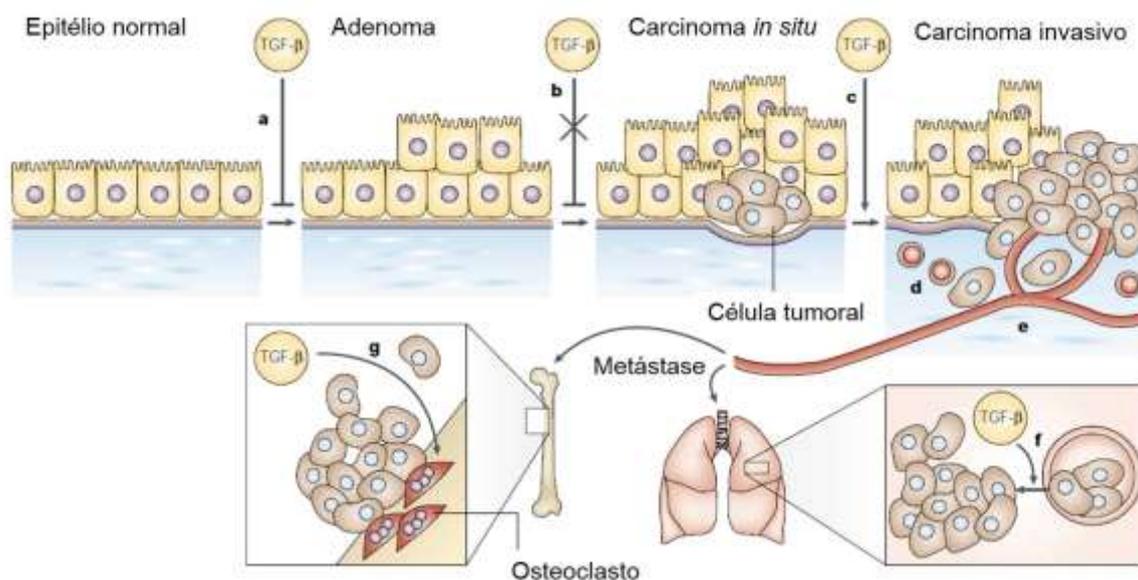


Figura 18 - Efeito dual de TGF- β no câncer. (a) TGF- β limita o crescimento de células epiteliais normais e de tumores em estágios iniciais. (b) A perda da responsividade à inibição do crescimento pela perda dos receptores de TGF- β ou de proteínas SMAD, ou pela perda específica de respostas gênicas citostáticas, seleciona tumores que crescem de forma mais agressiva, facilitando a aquisição de mutações oncogênicas adicionais. (c) Células tumorais que perderam a resposta citostática, mas mantêm os componentes da sinalização de TGF- β , podem passar por EMT em resposta a TGF- β , tornando-se mais invasivas. (d) TGF- β derivado do tumor cria um ambiente imunossupressor ao suprimir a função de células T, permitindo que as células tumorais escapem do *clearance* mediado por linfócitos T citotóxicos. (e) TGF- β pode induzir uma resposta angiogênica, favorecendo o crescimento tumoral e a sua disseminação sistêmica. (f) A adesão de células tumorais ao endotélio e/ou extravasamento de células tumorais nos sítios de metástase podem ser aumentados por TGF- β . (g). No câncer de mama, TGF- β pode induzir a metástase óssea. Adaptado de SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003.

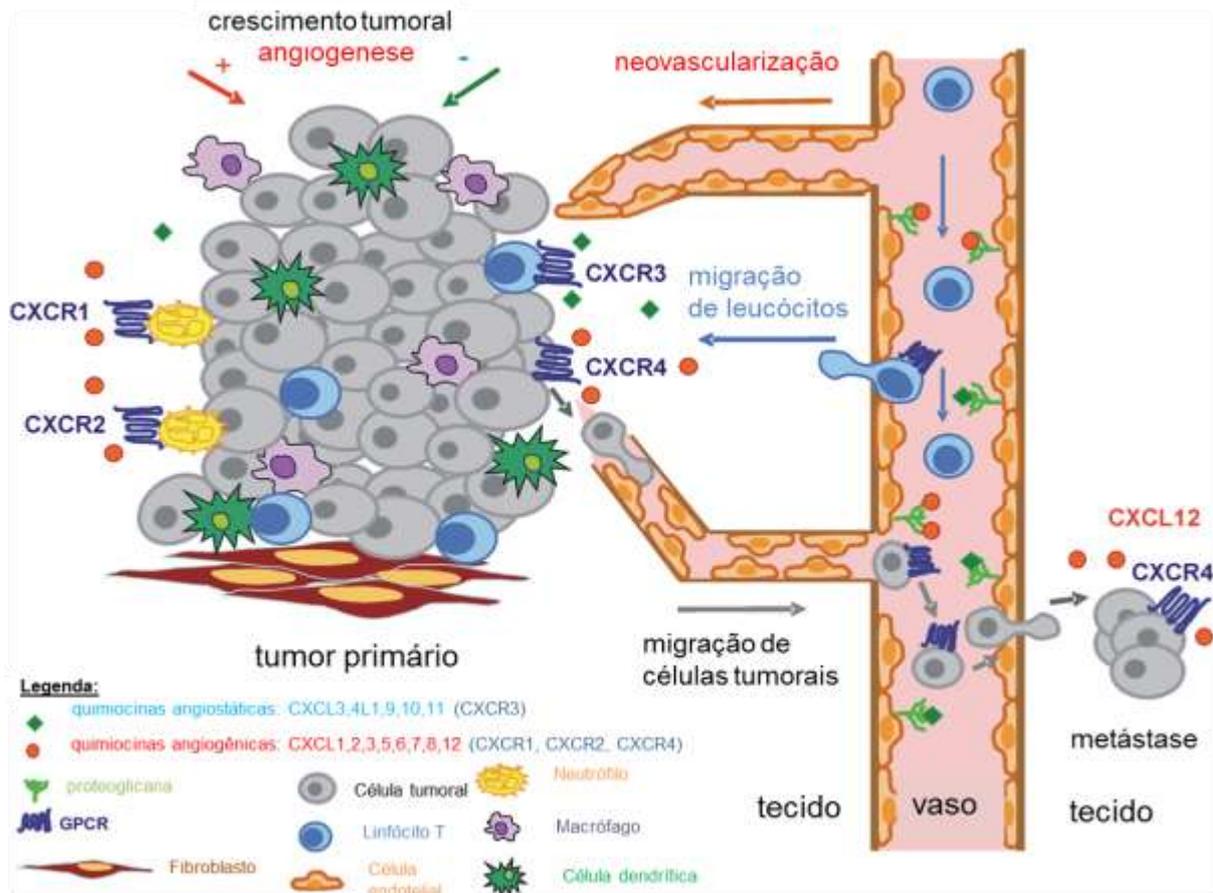


Figura 19 - O papel de quimiocinas CXC e seus receptores no ambiente tumoral. As quimiocinas CXC podem ser caracterizadas como sendo angiostáticas, atuando através do receptor CXCR3, ou angiogênicas, atuando através dos receptores CXCR1, CXCR2 e CXCR4. Essas quimiocinas também atuam promovendo a migração de células tumorais e a metástase. Ainda todas aquelas que possuem o tripeptídeo ácido glutâmico-leucina-arginina (motivo ELR) atraem neutrófilos pró-tumorais. Por outro lado, aquelas que não possuem o motivo ELR atraem linfócitos T citotóxicos CXCR3 ativados e células NK. Adaptado de VANDERCAPPELEN; VAN DAMME; STRUYF, 2008.

9. OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da cisplatina na progressão do CAOV.

9.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da cisplatina na migração e na quimiorresistência no CAOV:
 - Avaliação da migração através de ensaio de cicatrização;
 - Avaliação da resistência à cisplatina através de ensaio de MTT e formação de colônia.
- Avaliar o efeito da cisplatina na expressão do fenótipo CD44+CD24- em células de CAOV.
- Estudar o efeito da cisplatina na secreção de TGF- β 1 e CXCL2 pelas células tumorais.
- Estudar o efeito de CXCL2 na quimiorresistência à cisplatina adquirida por células A2780:
 - Avaliar o efeito de CXCL2 exógeno na indução da quimiorresistência;
 - Avaliar a expressão do receptor CXCR2 em resposta à cisplatina por qPCR.

10. MATERIAIS E MÉTODOS

10.1. LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste capítulo foram utilizadas células das linhagens A2780 (Sigma), derivada de CAOVS seroso, TOV21G (ATCC), derivada de CAOVS de células claras, e MDAH-2774 (ATCC), derivada de CAOVS endometrióide. Todas as linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de SFB (Sigma) e 1% de solução estabilizada de Penicilina-Estreptomicina (concentração final de 10 UI/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente) (Sigma). As demais condições de cultivo são idênticas às descritas na seção de Materiais e Métodos do capítulo anterior.

10.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE METABÓLICA CELULAR E CÁLCULO DE IC₅₀

Para calcular as concentrações de inibição do crescimento de 50% (IC₅₀) das células, empregou-se o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) através de ensaio utilizando-se MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma). Para tal, células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1.000 células por poço e incubadas por 24h nas condições padrão de cultivo para que aderissem. Após a adesão, o meio foi removido e as células foram tratadas com os agentes quimioterápicos num gradiente de concentração que variou de acordo com a droga (Tabela 4). Após outras 24h, adicionaram-se 100 µL de solução de MTT a 5 mg/mL e incubou-se por 4h. Por fim, após remoção do meio, adicionaram-se 100 µL de DMSO, para dissolução dos cristais de tetrazólio formados, e mediu-se a densidade óptica a 590 nm. Como controle negativo, utilizou-se excipiente (PBS 1X ou DMSO 2%, concentração final) em volume igual ao volume de droga utilizado. A média das leituras de quatro poços

foi utilizada para o cálculo de VCM, cujos valores foram utilizados para o cálculo de IC50 utilizando-se o *software* GraphPadPrism.

Tabela 4 - Concentrações finais dos quimioterápicos utilizadas para determinação dos valores de IC50.

Agente quimioterápico	Concentrações utilizadas (M)
Cisplatina	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
Doxorrubicina	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
Paclitaxel	10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11}

10.3. TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS

Células das linhagens A2780, TOV21G e MDAH-2774 foram tratadas com cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel na ordem de grandeza dos seus IC50 calculados experimentalmente conforme o item anterior. O tratamento ocorreu durante 5 dias consecutivos, durante os quais, novo meio contendo a droga era adicionado diariamente. Como controle, células foram mantidas em condições de cultura semelhante, porém o meio, também substituído diariamente, não continha a droga.

10.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para o ensaio de migração celular, seguiu-se protocolo de cicatrização previamente descrito (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Para tal, células foram cultivadas em placa de seis poços até atingirem confluências de pelo menos 90% e um arranhão foi feito com auxílio de uma ponteira de micropipeta. Após o arranhão, foi feita a lavagem dos poços para remoção das células livres, e novo meio foi adicionado. Avaliou-se a cicatrização ao longo de 24h. Para cada condição foram avaliados três arranhões, sendo que em cada um deles eram realizadas três medidas em três pontos definidos arbitrariamente. A média desses três pontos foi definida como a distância entre as margens de cada um dos arranhões. A cicatrização relativa foi calculada

como a razão entre a distância entre as margens em cada um dos tempos pelo valor do tempo zero. As imagens foram capturadas em microscópio invertido AxtioVert 40 CFL (Zeiss) e as análises foram realizadas utilizando-se *software* Axiovision R.4.6 (Zeiss). Os experimentos foram realizados em triplicata.

10.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para o ensaio de formação de colônia, seguiu-se protocolo estabelecido em nosso laboratório, 150 células foram semeadas por poço em placas de 12 poços. Após 24h, as células foram tratadas com cisplatina (0, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) por 24h. Após esse período, procedeu-se com a lavagem dos poços e adição de meio novo (500 μ L). Após 10 dias de cultivo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (p/v) e coradas com cristal violeta 1% (p/v). Os experimentos foram realizados em duplicata.

10.6. CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise do ciclo celular, após tripsinização, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e incubadas por 15 min em tampão contendo: Tris-HCl (ph 7,6) 3,4 mM, NaCl 10 mM, NP-40 0,1%, RNase 700 UI, iodeto de propídeo 0,075 mM. Células tratadas com docetaxel 1 μ M foram utilizadas como controle positivo. Para análise da expressão de CD44 e CD24, utilizamos anticorpos específicos anti-CD44-PeCy5.5 (Life Technologies) e anti-CD24-FITC (BD). As células, após tripsinizadas conforme descrito, foram lavadas duas vezes com SFB 1% em PBS 1X e incubadas por 30 min com 10 uL de cada anticorpo. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS. Para a compensação foram utilizados *beads* Calibrite (BD) marcados com os anticorpos mencionados acima. A análise foi feita em citômetro FACSCanto (BD), tendo sido coletados 10.000 eventos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

10.7. DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE

Para a dosagem de citocinas, coletou-se o sobrenadante das culturas das células tratadas com agentes quimioterápicos, ou controles não tratados após três (D3) e cinco dias (D5). Os sobrenadantes foram centrifugados a 13.000 rpm, por 10 min, para precipitar quaisquer *debris* celulares e armazenados a -80°C. A dosagem das citocinas foi feita através do método de ELISA sanduíche no Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, conforme protocolo já determinado (SOUZA et al., 2013). Os anticorpos utilizados, bem como os controles positivos, foram adquiridos da R&D System e estão descritos na Tabela 5. No momento da coleta do sobrenadante, foi realizada a dosagem de proteína total a partir de lisado proteico das células aderidas. Para preparação dos lisados proteicos, utilizou-se meio DOC (EGTA 1mM, DOC 1%, Hepes-Tris 0,02M e PBS 1X). A dosagem foi realizada pelo método de Lowry (OLIVER H. LOWRY, NIRA J. ROSEBROUGH, 1951). Dessa forma, expressou-se a concentração de citocinas do sobrenadante de cultura de forma relativa à massa proteica total das células aderidas ao frasco, em pg/mg de proteína.

Tabela 5 - Anticorpos e controles positivos utilizados nos ensaios de ELISA para dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura.

Alvo	Anticorpo primário	Anticorpo Biotinilado	Controle positivo (proteínas recombinante)
CXCL2	MAB453	BAF453	453-KC
TGF-β1	MAB2461	BAM2462	240-B

10.8. TRATAMENTO COM CXCL2 RECOMBINANTE

Células da linhagem A2780 foram semeadas em placas de 96 poços (1.000 células por poço) em meio padrão e mantidas durante a noite nas condições padrão de cultivo para que aderissem à placa. Em seguida, as células receberam um pré-

tratamento por 30 min com CXCL2 humano recombinante (R&D Systems, 276-GB) nas concentrações de 0,05nM, 0,1nM, 0,25nM, 0,5nM e 1nM. Em seguida, mantendo-se o tratamento com CXCL2, adicionou-se cisplatina 10^{-4} M ou 10^{-5} M. Após 24h de tratamento, realizou-se ensaio de MTT para determinação da VCM conforme descrito anteriormente. Como controles, utilizaram-se células não-tratadas com cisplatina e células tratadas com cisplatina em cada uma das concentrações descritas acima, tratadas apenas com PBS 1X, correspondente ao excipiente utilizado para diluição de CXCL2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

10.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)

A extração de RNA foi realizada com Trizol® Tri Reagent (Invitrogen®). A síntese de cDNA, a aquisição dos dados de expressão dos transcritos e a análise da expressão relativa dos transcritos foram feitas de forma semelhante ao descrito na seção de Materiais e Métodos do capítulo 1. O gene da beta-actina (*ACTB*) foi utilizado para normalização dos dados. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - *Primers* utilizados nos ensaios de qPCR

Gene-alvo	Sequência
CXCR2 F	5'-AATCCCCAGCACTCATCCCA-3'
CXCR2 R	5'-CTTAAATCCTGACTGGGTCGCT-3'
ACTB F	5'-GCACAGAGCCTCGCCTTT-3'
ACTB R	5'-CCACGATGGAGGGGAAGA-3'

F, *forward*. R, *reverse*.

10.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Conforme descrito no capítulo anterior, todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Análises para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos experimentais foram realizadas

através de Teste T de Student não-pareado. Um valor $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativa. As análises foram realizadas no *software* GraphPadPrism v.5.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IC50 DAS DROGAS

Os valores de IC50 das drogas cisplatina (CISP), doxorrubicina (DOXO) e paclitaxel (PACLI) para as células A2780, MDAH-2774 e TOV21G, representativas de CAO dos subtipos histológicos seroso, endometriode e de células claras, respectivamente, foram calculados a partir de experimentos de MTT. Para tal, as células foram expostas por 24h às drogas em cinco concentrações. A saber: CISP ($10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ M), DOXO ($10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ M), e PACLI ($10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}$ M). Ao final, procedeu-se com o ensaio de MTT e, a partir da VCM das células, calculamos o valor de IC50 das drogas, através de uma regressão não linear, utilizando-se o *software* Graph Pad Prism. Os valores de IC50 calculados e a concentração de cada droga utilizada para o tratamento de cada uma das linhagens são apresentados na Tabela 7. A fim de padronizar-se o tratamento entre as linhagens e para as diferentes drogas, estabeleceu-se o emprego das mesmas nas ordens de grandeza de seus IC50 calculados.

Tabela 7 - Valores de IC50 de cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel calculados e utilizados para as linhagens A2780, MDAH-2774 e TOV-21G

Linhagem celular	IC50 (M)			
		Cisplatina	Doxorrubicina	Paclitaxel
A2780	Calculado	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-7}$
	Utilizado	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-7}$
MDAH-2774	Calculado	$1,4 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-7}$
	Utilizado	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-7}$
TOV-21G	Calculado	$1,6 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-7}$
	Utilizado	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-7}$

11.2. CISPLATINA INDUZ A MIGRAÇÃO E A RESISTÊNCIA EM CÉLULAS DE CAO V A2780

Conforme previamente discutido no presente trabalho, a capacidade migratória/metastática das células cancerosas, bem como o desenvolvimento de quimiorresistência pelas mesmas, podem ser considerados fatores fundamentais para a determinação do prognóstico do câncer. Sendo assim, o entendimento dos mecanismos de desencadeamento dos processos supracitados em resposta à quimioterapia podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a doença. Dessa forma, analisou-se, primeiramente, o efeito do tratamento com cisplatina por cinco dias na migração e no desenvolvimento de quimiorresistência em células de CAO V.

A fim de verificar o efeito da cisplatina na migração de células de CAO V, ensaios de cicatrização foram realizados. Para esses experimentos, células da linhagem A2780 foram expostas à cisplatina na concentração de 10^{-5} M, a qual corresponde à ordem de grandeza da sua IC50, conforme apresentado na Tabela 7. Após o tratamento, as células foram mantidas em meio padrão até que atingissem confluência. As medidas das distâncias entre as margens foram realizadas nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24h. Verificou-se, por meio desse ensaio, que, 24h após o início do experimento, as células tratadas com cisplatina apresentaram um maior potencial migratório ($P=0,0333$) como evidenciado pela cobertura de praticamente toda a área inicial, ao passo que as células do grupo controle tiveram taxa de cicatrização relativa de cerca de 65% (Figura 20). Nos demais tempos experimentais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo (dados não mostrados). Nossos dados iniciais sugerem que a cisplatina pode contribuir para a progressão do CAO V metastático.

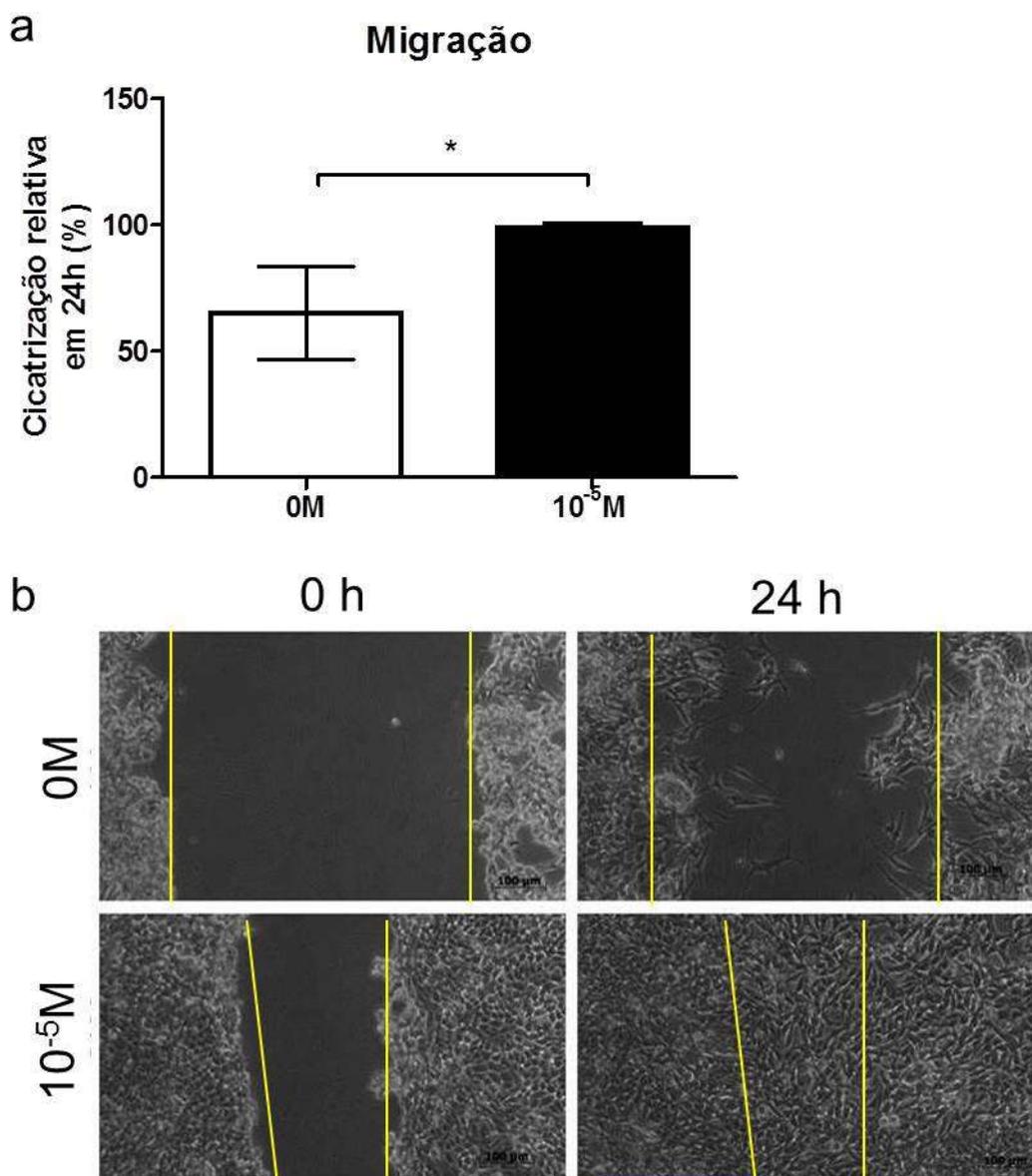


Figura 20 - Efeito da cisplatina na migração celular. Células da linhagem A2780 tratadas com cisplatina 10^{-5} M, ou não tratadas, tiveram a sua capacidade de migração avaliada por ensaio de cicatrização realizado durante 24h. (a) As médias das distâncias entre as margens, medidas em três pontos, foram utilizadas para cálculo da cicatrização relativa, a qual revelou um aumento significativo na capacidade migratória das células após o tratamento com cisplatina por cinco dias. (b) Imagens representativas de experimentos realizados em triplicata mostram as cicatrizes nos tempos zero e 24h para as condições controle (0M) e tratada com cisplatina (10^{-5} M). Teste T. * indica $P \leq 0,05$.

Para análise da indução de quimiorresistência à cisplatina em células de CAO, células da linhagem A2780 foram pré-tratadas com cisplatina 10^{-5} M por cinco dias antes da realização de ensaios de MTT, para cálculo da VCM, e formação de colônia onde células do grupo controle ou que receberam o pré-tratamento foram novamente expostas à cisplatina ($0-10^{-4}$ M).

Através da análise da VCM, verificou-se que células pré-tratadas com a droga apresentaram VCM de aproximadamente 97% quando expostas à maior concentração de cisplatina testada (10^{-4} M), enquanto as do grupo controle não pré-tratadas apresentaram VCM de aproximadamente 65% ($P=0,0016$) (Figura 21). Na concentração de 10^{-5} M, também observamos um aumento da VCM das células pré-tratadas com cisplatina, que apresentaram viabilidade de cerca de 95%, em relação aos 80% apresentados pelas células que não receberam o pré-tratamento ($P=0,033$) (Figura 21). Em relação à viabilidade celular medida pelo ensaio de formação de colônia, os resultados foram inconclusivos uma vez que houve uma grande diferença na taxa de proliferação e viabilidade das células na situação controle (sem adição de cisplatina) (Figura 22).

Tendo em vista essa diferença aparente na taxa de proliferação das células, foi realizada análise de ciclo celular. Verificou-se através dessa que, enquanto as células que não receberam tratamento estavam majoritariamente na fase G0/G1 do ciclo celular (83,1%, $P=0,002$), o tratamento com cisplatina induziu uma parada na fase G2/M (60,9%, $P\leq 0,001$) (Figura 23). Não houve diferença na porcentagem de células na fase S ($P=0,0558$). Paradas no ciclo celular em resposta à cisplatina já foram descritas (CHEN et al., 2013; LUNDHOLM et al., 2013; MEIRELLES et al., 2012; SHEN et al., 2013; WAGNER; KARNITZ, 2009; WIEGAND et al., 2010). Embora, na maioria das vezes, essas paradas levem à senescência e à apoptose,

em alguns casos podem representar um mecanismo de resistência. Por exemplo, células que se encontram na fase G₁ do ciclo celular apresentam maior sensibilidade à cisplatina do que aquelas que se encontram na fase S (revisado por SHAH; SCHWARTZ, 2001). Por outro lado, sabe-se que células murinas de leucemia expostas a 0,8x10⁻⁵M de cisplatina sofrem um bloqueio do ciclo celular em G₂, o qual é revertido após aproximadamente 10 dias, quando as células passam a proliferar tornando-se predominantes na cultura (SORENSEN; EASTMAN, 1988). Sendo assim, é possível que a parada no ciclo celular em G₂/M, observada nas células A2780 após o tratamento com cisplatina, represente um mecanismo de resistência à droga.

Diante das observações de que a cisplatina aumenta a resistência das células e o seu potencial migratório, buscou-se identificar os possíveis mecanismos envolvidos nesses fenótipos.

11.3. EFEITO DA CISPLATINA NO FENÓTIPO DE CSC DE CÉLULAS DE CAO V A2780

Buscando avaliar a ocorrência de CSC em linhagem A2780, analisou-se a expressão de CD44 e CD24, sendo bem estabelecido que o fenótipo CD44⁺CD24⁻ é característico de CSC (MENG et al., 2012; RICARDO et al., 2011). Diante disto, células da linhagem A2780 foram expostas à cisplatina 10⁻⁵M e avaliou-se, ao final do tratamento, a expressão de CD44 e CD24 por citometria de fluxo. Verificou-se que o tratamento com cisplatina induziu o aumento estatisticamente significativo (P=0,0032) na porcentagem de células que passaram a apresentar o fenótipo CD44⁺CD24⁻ (Figura 24).

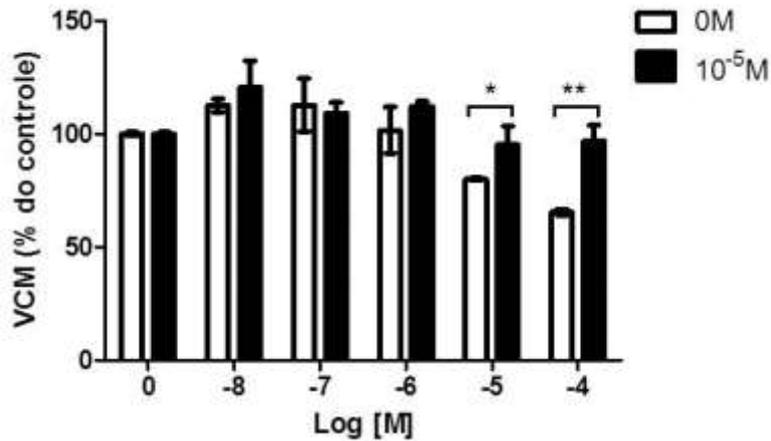


Figura 21 - Efeito da cisplatina na indução da resistência. Células da linhagem A2780 foram pré-tratadas com cisplatina 10^{-5} M, ou mantidas na situação controle não tratada, antes da realização de ensaio de MTT para determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) em resposta ao tratamento com cisplatina (10^{-8} - 10^{-4} M). Verificou-se que o grupo pré-tratado apresentou aumento da VCM em resposta à cisplatina nas concentrações de 10^{-5} M e 10^{-4} M em relação ao grupo controle, indicando indução de quimiorresistência à cisplatina em resposta ao pré-tratamento. Os valores são a média de dois experimentos independentes, cada um realizado em quadruplicata. Teste T não pareado foi realizado. * indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$.

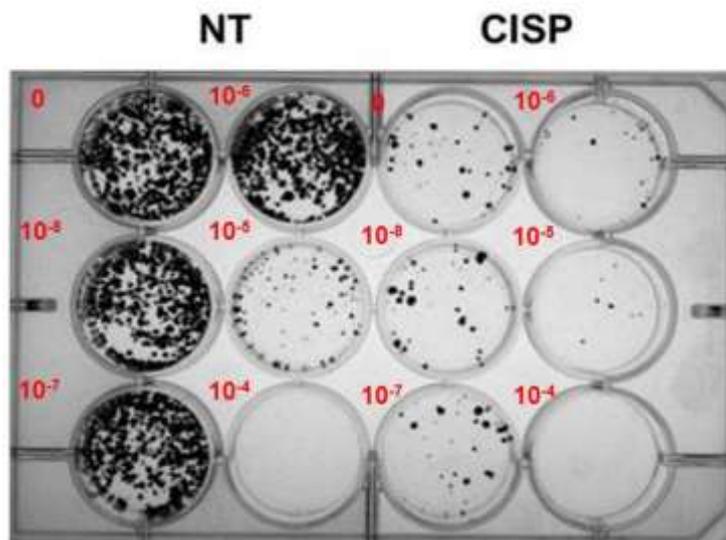


Figura 22 - Efeito da cisplatina na formação de colônias. Células parentais (NT) ou tratadas por cinco dias com cisplatina (CISP) foram semeadas na densidade de 150 células por poço, tratadas com concentrações crescentes de cisplatina por 24h e então mantidas em cultura por 10 dias, quando foram fixadas com paraformaldeído 4% (p/v) e coradas com cristal violeta 1% (p/v). Os resultados foram inconclusivos em relação à aquisição de fenótipo quimiorresistente devido à variação no número de colônias na situação controle (0M); contudo indicam para um possível papel da cisplatina na progressão do ciclo celular. Imagem representativa dos resultados (n=2).

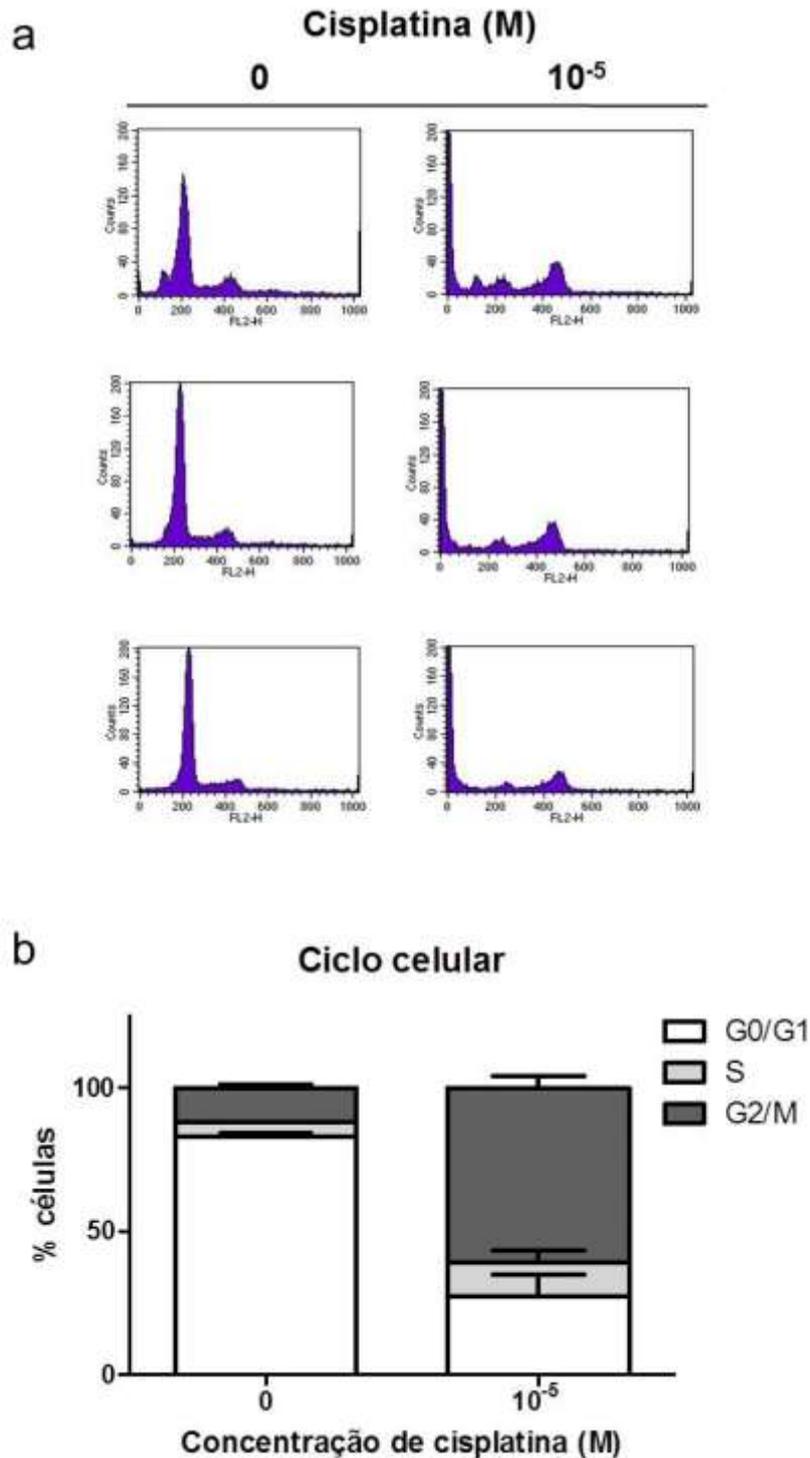


Figura 23 - Efeito da cisplatina no ciclo celular. A análise do ciclo celular foi realizada em células da linhagem A2480 não expostas à cisplatina, e em células expostas a 10^{-5} M da droga por cinco dias. (a) Histogramas mostrando a distribuição das células ao longo das fases do ciclo celular em três experimentos independentes onde 10.000 eventos foram coletados em cada. (b) Distribuição relativa média entre as fases G0/G1, S e G2/M é mostrada. As populações diferem significativamente entre as proporções em G0/G1 ($P=0,002$) e G2/M ($P\leq 0,001$). Teste T não pareado foi realizado.

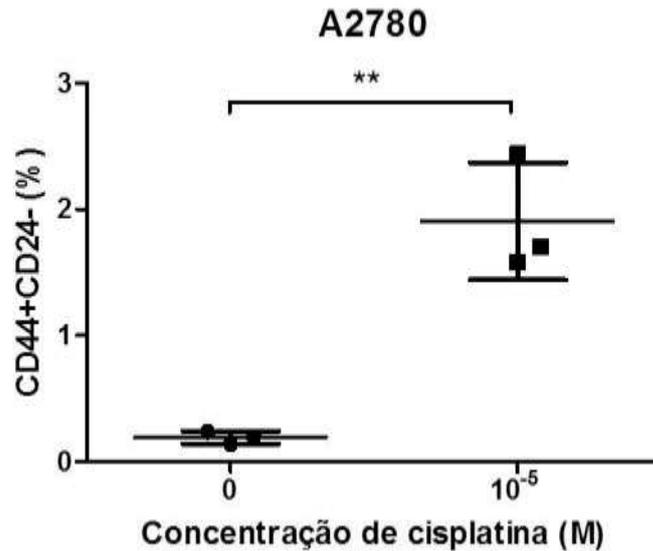


Figura 24 - Cisplatina induz o fenótipo CD44+CD24-. Células da linhagem A2780 foram expostas à cisplatina por cinco dias consecutivos. No sexto dia, as células foram preparadas para análise por citometria de fluxo utilizando-se anticorpo anti-CD44-Cy5/PE e anti-CD24-FITC. Para as análises, coletaram-se 10.000 eventos e utilizamos *beads* Calibrite (BD) marcados com cada um dos anticorpos mencionados acima. Estatística: O valor de P obtido através de Teste T de Student bicaudal está indicado no gráfico.

As expressões de CD44 e CD24 variam consistentemente entre diferentes linhagens celulares, refletindo a heterogeneidade tumoral (JAGGUPILLI; ELKORD, 2012). Um estudo analisou a expressão dessas proteínas em quatro linhagens celulares de CAO V por citometria de fluxo (JAGGUPILLI; ELKORD, 2012). Para a linhagem A2780, os autores descrevem que 100% das células são duplo-negativas para essas proteínas. Em nossa análise, encontraram-se, dentre as células que não receberam tratamento com cisplatina, cerca de 80%, em média, com fenótipo duplo-negativo. Ainda, verificou-se que 17% das células foram CD44-CD24+, 1,9% foram CD44+CD24+ e apenas 0,2% foram CD44+CD24- (dados não mostrados). Após o tratamento com cisplatina, notou-se que aproximadamente 47% das células foram CD44-CD24-, 10% foram CD44-CD24+, 41% foram CD44+CD24+ e 1,9% foram CD44+CD24- (dados não mostrados). Verificou-se que o tratamento com cisplatina aumentou em cerca de 10 vezes a população CD44+CD24-, indicando a indução do

fenótipo de CSC em CAOV pela cisplatina. Apesar da proporção de células CD44+CD24- em relação ao total ser baixa, está de acordo com a observação de que essas células representam uma população rara dentro do contexto tumor (CLARKE et al., 2006). De fato, existe ainda uma grande discrepância entre diferentes estudos, seja com pacientes ou entre diferentes linhagens celulares do mesmo tipo de câncer, inexistindo determinação de uma proporção de CSC ou marcadores individuais capazes de formar um novo tumor ou metástases (MENG et al., 2012).

Populações de células CD44+CD24- já foram associadas ao fenótipo de CSC em diferentes tipos de tumores. No câncer de mama, onde elas foram primeiramente descritas como representando CSC, células CD44+CD24- foram associadas à marcada tumorigenicidade (AL-HAJJ et al., 2003), fenótipo indiferenciado, capacidade de auto-renovação, propagação e diferenciação em diversas linhagens epiteliais mamárias (PONTI et al., 2005), capacidade de invasão e quimiorresistência, além de poderem ser selecionadas pelo tratamento prolongado com doxorrubicina (CALCAGNO et al., 2010). No CAOV, o fenótipo CD44+CD24- também já foi relacionado ao fenótipo CSC (MENG et al., 2012). No trabalho em debate, os autores descrevem uma correlação entre a proporção de células CD44+CD24- nas linhagens celulares de CAOV TOV112D, SKOV3, OV90 e ES2 e a agressividade do tipo histológico correspondente a cada uma das linhagens. Ainda, essas células apresentaram maior potencial migratório e quimiorresistência a taxol, carboplatina ou a combinação dos dois comparados às células totais. Por fim, os autores demonstraram que quando mais de 25% das células provenientes de ascite de pacientes com CAOV apresentavam o fenótipo CD44+CD24-, as pacientes tinham maior probabilidade de apresentar tumor recorrente e de terem menor tempo

de sobrevida livre da doença. Outro estudo verificou que o fenótipo CD44+CD24- é enriquecido em células capazes de crescer de forma independente de ancoragem derivadas da linhagem de adenocarcinoma ovariano 3AO (SHI et al., 2010). As células isoladas dessa maneira mostraram-se altamente tumorigênicas, capazes de auto-renovação e diferenciação, e resistentes à carboplatina e ao paclitaxel.

De forma geral, nossos resultados apontam para a indução do fenótipo, ou seleção de células, CD44+CD24-, as quais apresentam características de CSC. Tanto o aumento do potencial migratório quanto da quimiorresistência foram observados em resposta ao tratamento com cisplatina por cinco dias. Contudo, apesar de células CD44+CD24- poderem estar contribuindo para os efeitos observados, provavelmente não são o único mecanismo responsável por eles, uma vez que a ocorrência do fenótipo é de prevalência baixa no modelo estudado. Sendo assim, buscou-se identificar outros mecanismos que podem contribuir para a promoção da migração e da resistência após o tratamento com cisplatina, bem como para tentar explicar o mecanismo de geração de CSC em resposta à cisplatina em CAO V.

11.4. EFEITO DA CISPLATINA NA SECREÇÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS DE CAO V

O papel de diversas citocinas regulando a progressão do câncer já foi descrito (revisado por CHIN; WANG, 2014; revisado por MASSAGUÉ, 2008; revisado por VANDERCAPPELLEN; VAN DAMME; STRUYF, 2008). Dentre as citocinas potencialmente importantes para o CAO V, podemos destacar o TGF- β 1 e o CXCL2. TGF- β 1 pode induzir fenótipos indiferenciados e migratórios, tanto dependente quanto independente de EMT, no CAO V (GAO et al., 2014a). Por sua vez, CXCL2 atua induzindo migração e quimiorresistência no câncer de mama (ACHARYYA et al., 2012). Por outro lado, a inibição farmacológica do seu receptor, CXCR2, resulta

na sensibilização de células cancerosas à quimioterapia e na diminuição do crescimento tumoral e da metástase (SHARMA et al., 2013).

Dessa forma, avaliou-se o efeito de CISP, DOXO e PACLI na secreção de TGF- β 1 e CXCL2 por três linhagem celulares de CAO V derivadas de três tipos histológicos diferentes da doença: A2780, seroso; TOV21G, células claras; MDAH-2774, endometrióide. Cada quimioterápico foi utilizado na ordem de grandeza de sua IC50, conforme apresentado na Tabela 7, por cinco dias consecutivos como descrito em Materiais e Métodos. Após três (D3) e cinco (D5) dias de tratamento, o sobrenadante de cultivo foi coletado para quantificação das citocinas e as células foram contadas em câmara de Neubauer para cálculo da viabilidade utilizando-se azul de tripan. A Tabela 8 apresenta as viabilidades médias e número médio de células calculados a partir de triplicatas.

Tabela 8 - Número e viabilidade das células A2780, MDAH-2774 e TOV21G após três e cinco dias de cultivo na condição não tratada, ou tratada com cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel nas concentrações descritas na Tabela 7.

Condição		Número de células vivas $\times 10^4 \pm dp$ (% viabilidade)		
		A2780	MDAH-2774	TOV21G
NT	D3	529,20 \pm 179,70 (99,2)	97,17 \pm 29,02(98,4)	45,17 \pm 23,71 (97,5)
	D5	237,30 \pm 64,04 (100)	297,13 \pm 201,68 (98)	121,83 \pm 31,40 (99,0)
CISP	D3	2,98 \pm 0,45 (100)	3,25 \pm 0,71(91,47)	2,63 \pm 0,77 (87,7)
	D5	3,65 \pm 3,66 (96,8)	2,73 \pm 0,81(47)	3,47 \pm 0,80 (96,9)
DOXO	D3	1,91 \pm 0,76 (94,9)	3,6 \pm 1,29(95,77)	4,57 \pm 0,66 (96,7)
	D5	1,2 \pm 0,30 (100)	0,35 \pm 0,21 (85)	2,21 \pm 0,24 (100)
PACLI	D3	3,20 \pm 1,50 (95,2)	0,72 \pm 0,19(88,4)	1,83 \pm 0,21 (93,4)
	D5	1,48 \pm 0,31 (89,2)	0,12 \pm 0,10 (66,7)	0,67 \pm 0,29 (100)

NT, não tratado; CISP, cisplatina; DOXO, doxorrubicina; PACLI, paclitaxel.

Em relação ao TGF- β 1, verificou-se que apenas a linhagem TOV21G apresentou aumento de secreção da citocina em resposta à cisplatina no D5, apenas (Figura 25a). Nas demais condições testadas, observou-se a redução da secreção de TGF- β 1 em resposta à quimioterapia (Figura 25b,c). Assim, esses resultados sugerem que, de forma geral, TGF- β 1 não participa induzindo a migração das células tumorais no CAOv, ou a formação de CSC através de EMT. Contudo, sabe-se que TGF- β 1 tem um papel importante e dualístico na progressão tumoral, podendo tanto suprimir a progressão tumoral, quanto induzir a invasão celular; além do seu efeito sobre células presentes no microambiente tumoral regulando a resposta imune antitumoral (revisado por MASSAGUÉ, 2008). Nesse contexto, a partir do momento em que as células adquirem o fenótipo maligno, TGF- β secretado por essas células passa a bloquear a resposta imune antitumoral ao proporcionar a atividade de células regulatórias e pelo bloqueio direto de células efetoras, impedindo que essas removam as células tumorais (revisado por FLAVELL et al., 2010). De fato, esse

efeito dualístico de TGF- β 1 já foi demonstrado no CAO, onde, enquanto essa citocina induz migração em células de tumores *borderline* serosos através da indução de EMT, ocorre a indução de apoptose em células de carcinoma seroso de baixo grau (CHENG; AUERSPERG; LEUNG, 2012). Assim, a diminuição da secreção dessa citocina pelos agentes quimioterápicos observada na maioria das condições estudadas pode não somente afetar a progressão tumoral, como também representar um mecanismo de ação das drogas ainda não descrito. Ainda, um fato que chama a atenção é que a única condição em que TGF- β 1 teve sua secreção induzida foi em resposta à cisplatina na linhagem TOV21G. Essa linhagem é representativa de carcinomas ovarianos de células claras, os quais, assim como os tumores mucinosos, são particularmente refratários à terapia baseada em platina (KURIAN et al., 2005). O papel de TGF- β 1 induzindo a resistência à cisplatina em carcinoma colorretal já foi descrito (BRUNEN et al., 2013). Sendo assim, é possível que o aumento da produção de TGF- β 1 por essas células em resposta à cisplatina configure um possível mecanismo de sobrevivência desse subtipo histológico de CAO.

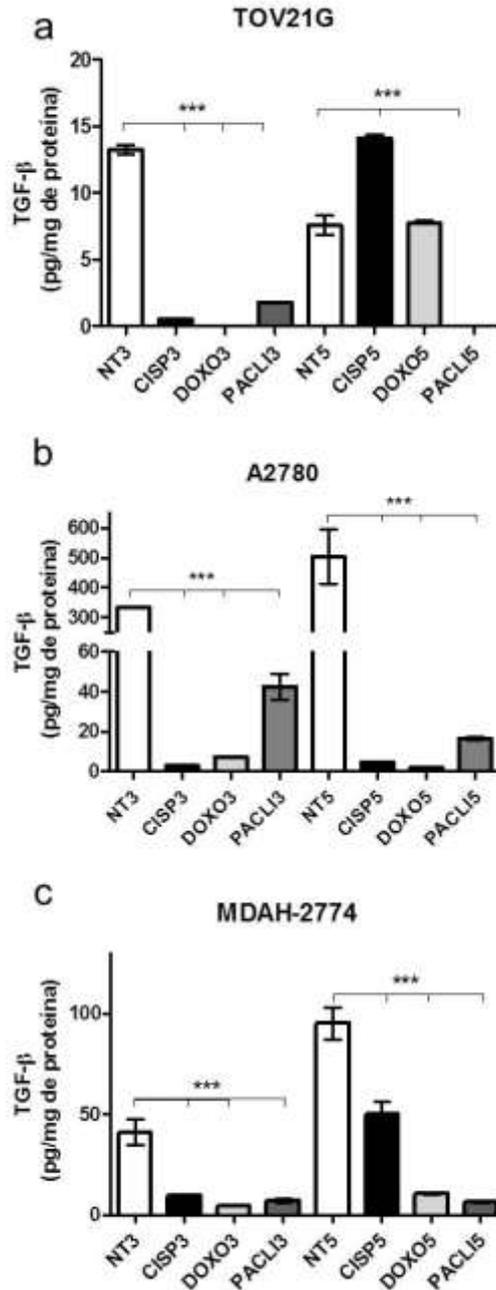


Figura 25 - Efeito do tratamento com quimioterápicos na secreção de TGF-β1 por células de CAOV. Células das linhagens (a) A2780, (b) MDAH-2774 e (c) TOV-21G foram tratadas com CISP, DOXO e PACLI e após três e cinco dias de tratamento, o sobrenadante das culturas foi coletado e analisado pelo método de ELISA para verificar a presença de TGF-β1, comparando-se com as concentrações no controle não tratado. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes, onde a concentração de citocina é expressa de forma relativa à massa proteica das células aderidas à superfície do frasco, em pg/mg de proteína. ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey foi realizada. *** indica $P \leq 0,001$.

De forma análoga ao que foi feito para o estudo da secreção de TGF- β 1, células das linhagens A2780, MDAH-2774 e TOV21G foram expostas à CISP, PACLI e DOXO e a presença de CXCL2 nos sobrenadantes de cultura foi medida nos dias D3 e D5 de tratamento. Verificou-se que enquanto DOXO e PACLI não tiveram efeito sobre a secreção de CXCL2 pelas células (dados não mostrados), CISP induziu a secreção da quimiocina nas linhagens A2780 e TOV21G, após cinco dias de tratamento, e em MDAH-2774, após três dias de cultura (Figura 26). Analisando quantitativamente os resultados, viu-se que A2780 e TOV21G secretaram as maiores concentrações de CXCL2, 25 e 8 pg/mg de proteína, respectivamente. Células da linhagem MDAH-2774 secretaram apenas 2 pg/mg de proteína no terceiro dia e depois cessaram a secreção de CXCL2. É interessante ressaltar que, além de o efeito indutor da secreção de CXCL2 parecer ser exclusivo de CISP em relação aos demais quimioterápicos, existe uma relação entre a secreção dessa quimiocina *in vitro* e a resposta *in vivo* à droga. Nesse contexto, sabe-se que tumores de células claras, dos quais células TOV21G são derivados, apresentam resistência intrínseca à terapia baseada em derivados de platina (KURIAN et al., 2005). Por outro lado, a grande maioria dos casos do CAOV epitelial é do tipo seroso, do qual deriva A2780, e a quimiorresistência é um fator predominante nessa doença (revisado por SOSLOW, 2008). Sendo assim, é possível que a quimiorresistência e a migração induzidas por cisplatina sejam deflagradas, ao menos em parte, por mecanismos dependentes de CXCL2.

Estudos recentes apontaram para CXCL2, juntamente com CXCL1, como um fator indutor, tanto de quimiorresistência, como de migração celular em câncer de mama (ACHARYYA et al., 2012). Nesse estudo, foi demonstrado que, à medida que as células adquirem fenótipo maligno e metastático, ocorre o aumento da expressão de

ambos, CXCL1 e CXCL2 pelas células tumorais. Ainda, um outro estudo verificou que CXCL2, mas não CXCL1, pode induzir a migração de células musculares lisas de vias aéreas de pacientes asmáticos e que esse mecanismo é dependente de CXCR2 e de p38 MAPK (AL-ALWAN et al., 2013). Ademais, sabe-se que a inibição de CXCR2 traz uma melhora na resposta à quimioterapia, inibe o crescimento tumoral, a angiogênese e a metástase pulmonar de células de carcinoma mamário (SHARMA et al., 2013). Dessa forma, acreditamos que o aumento da secreção de CXCL2 em resposta à CISP seja um provável mecanismo indutor da migração e da quimiorresistência adquirida por células de CAOV, o qual pode atuar conjuntamente com a indução do fenótipo de CSC contribuindo para a progressão do CAOV.

11.5. EFEITO DE CXCL2 EXÓGENO NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA

A fim de verificar o efeito de CXCL2 na aquisição da quimiorresistência, células da linhagem A2780 foram tratadas com CXCL2 recombinante e a sua VCM foi avaliada em resposta à cisplatina nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-5} M. Essas concentrações foram escolhidas pois são aquelas em que houve aumento da VCM, em resposta ao pré-tratamento com cisplatina por cinco dias (Figura 21), que resultou no aumento da secreção de CXCL2 (Figura 26). Observou-se, porém, que o CXCL2 recombinante não induziu a resistência à cisplatina em nenhuma das concentrações testadas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 27). Questionou-se, dessa forma, se, além do aumento da expressão de CXCL2, a cisplatina também poderia estar induzindo o aumento da expressão de CXCR2, um dos receptores aos quais CXCL2 pode se ligar e cuja função já foi relacionada à resistência à terapia no câncer de mama (SHARMA et al., 2013). Viu-se que, de fato, o tratamento com cisplatina 10^{-5} M por cinco dias levou ao aumento da expressão de CXCR2 ($P=0,0111$) por células A2780, conforme demonstrado por

qPCR (Figura 28). Dessa forma, a ausência de efeito CXCL2 recombinante na aquisição de resistência pelas células, que foi observada, pode, em parte, ser explicada pelo efeito de cisplatina, não apenas induzindo a secreção do ligante, mas como da expressão de seu receptor. Dessa forma, experimentos que mostrem o efeito do bloqueio de CXCR2 na reversão da resistência adquirida à cisplatina, em resposta ao tratamento com a droga, serão necessários para poder avaliar o efeito dessa via na quimiorresistência no CAOV.

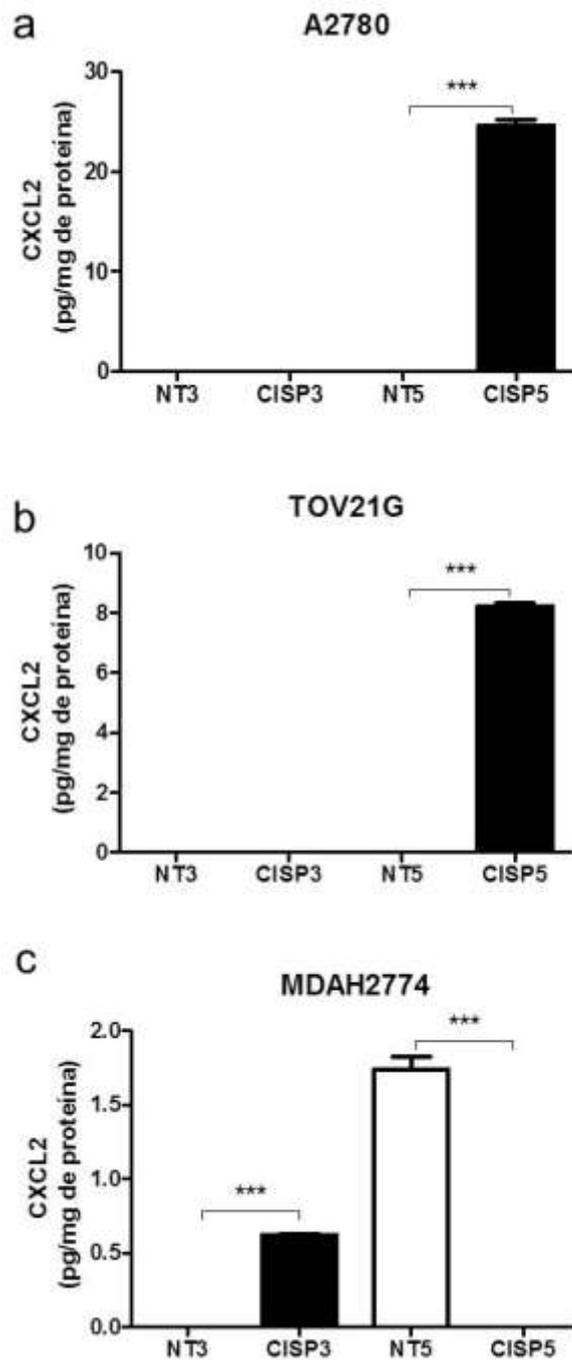


Figura 26 - Efeito do tratamento com quimioterápicos na secreção de CXCL2 por células de CAOV. Células das linhagens (a) A2780, (b) TOV21G e (c) MDAH-2774 foram tratadas com cisplatina por cinco dias. Após três e cinco dias de tratamento, o sobrenadante das culturas foi coletado e analisado pelo método de ELISA para verificar a presença de CXCL2, comparando-se com as concentrações no controle não-tratado. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes, onde a concentração de citocina é expressa de forma relativa à massa proteica das células aderidas à superfície do frasco, em pg/mg de proteína. ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey foi realizada *** indica $P \leq 0,001$.

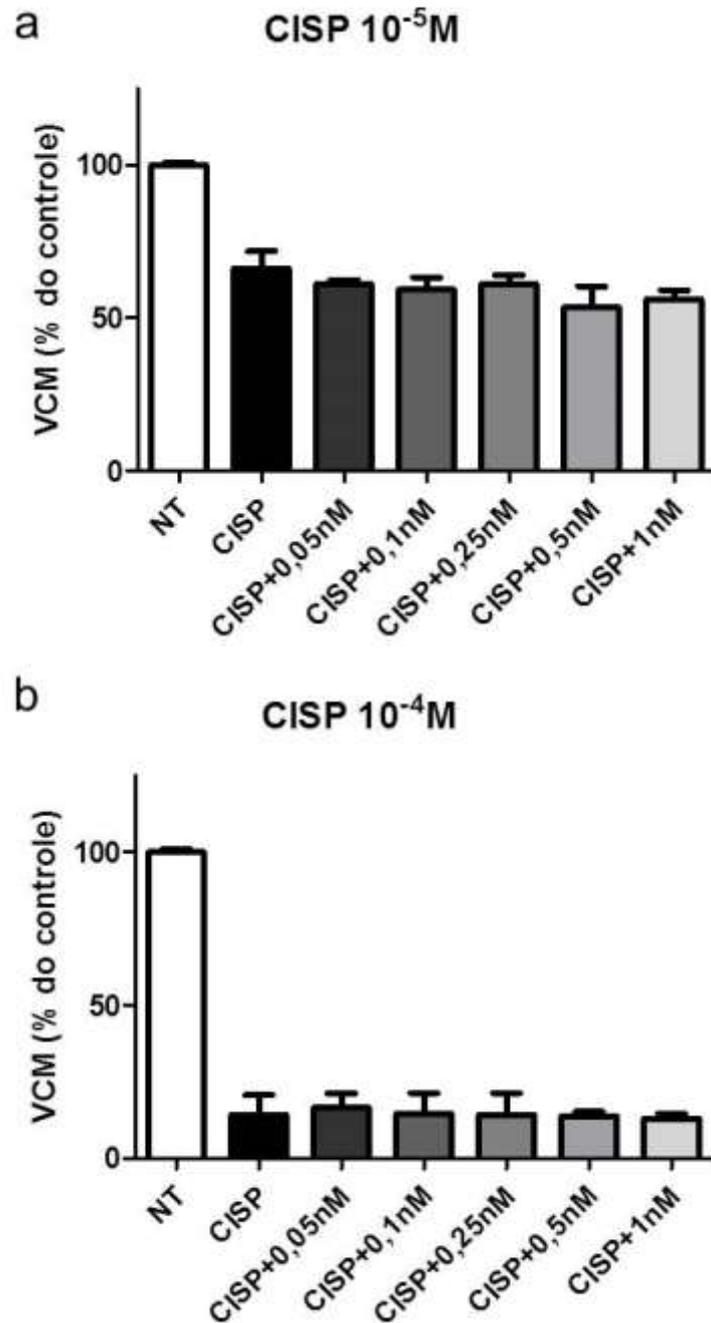


Figura 27 - Efeito de CXCL2 recombinante na resistência à cisplatina. Células da linhagem A2780 receberam pré-tratamento com CXCL2 recombinante (0,05nM, 0,1nM, 0,25nM, 0,5nM, 1nM) por 30 min antes de serem tratadas com cisplatina nas concentrações de (a) 10⁻⁵M e (b) 10⁻⁴M por 24h, durante os quais manteve-se o tratamento com CXCL2 exógeno. Após 24h, realizou-se ensaio de MTT para cálculo da VCM.

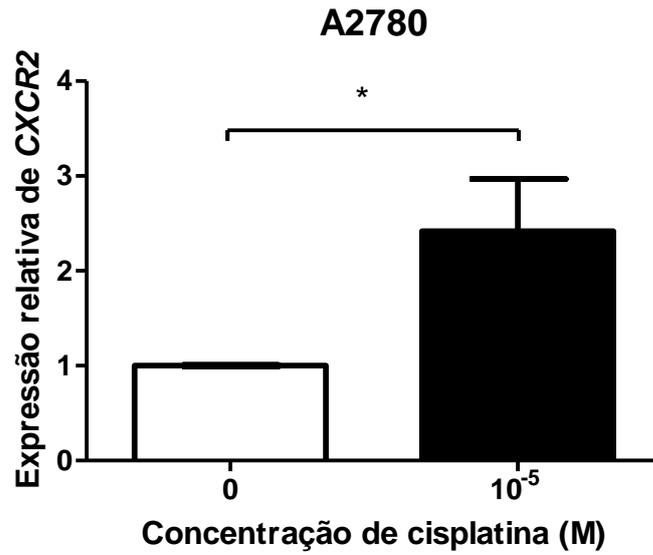


Figura 28 - Efeito da cisplatina na expressão de *CXCR2*. Células da linhagem A2780 foram tratadas por cinco dias com cisplatina 10^{-5} M e tiveram a expressão de *CXCR2* avaliada por qPCR. Teste T não pareado foi realizado. * indica $P \leq 0,05$.

12. CONCLUSÕES

No presente trabalho identificaram-se diferentes mecanismos celulares apresentados por células de CAOV que poderiam estar contribuindo na resistência à quimioterapia, em resposta a um tratamento com cisplatina. Os mecanismos identificados incluem alterações no ciclo celular, aquisição de fenótipo de CSC, secreção das citocinas TGF- β e CXCL2 e aumento da expressão do receptor CXCR2. Já foi demonstrado que todos esses fatores podem promover tanto o aumento da resistência, quanto da migração em diferentes modelos tumorais. Aqui mostrou-se o efeito da cisplatina, um dos principais fármacos aplicados na terapia do CAOV, modulando esses efeitos. De nosso conhecimento, não há relatos na literatura do efeito indutor da secreção de CXCL2 e da expressão de CXCR2 em resposta à cisplatina no CAOV. Apesar de ainda não termos mostrado de forma conclusiva a participação dessas moléculas na quimiorresistência, dados da literatura indicam que essa relação possa ser verdadeira, e experimentos nos quais o efeito do bloqueio do receptor CXCR2 na reversão da resistência adquirida pelas células em resposta à cisplatina estão em andamento. Ainda em relação à secreção de citocinas, visto que os efeitos indutores da secreção tanto de TGF- β 1 quanto de CXCL2 parecem ser exclusivamente em resposta à cisplatina, em comparação aos outros fármacos utilizados, acreditamos que estudos que comparem o efeito observado em resposta à cisplatina, com aqueles da carboplatina, droga análoga equipotente também utilizada na terapia do CAOV, poderão trazer dados que suportem a escolha de uma em detrimento da outra. De forma geral, acreditamos que os dados apresentados no presente capítulo trazem conhecimento que poderá trazer novas perspectivas no tratamento do CAOV.

13. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho abordou em dois capítulos distintos temas relacionados à progressão do CAO. No primeiro capítulo, mostrou-se um mecanismo através do qual NAC1 interage com BCL6 regulando a expressão de genes-alvo, como demonstrado através do estudo do papel do complexo NAC1/BCL6 na regulação de *FOXQ1*, um alvo direto de regulação de NAC1 previamente descrito. Nesse capítulo também se mostrou que existe uma forte correlação positiva entre a expressão de NAC1 e BCL6 em linhagens e tumores ovarianos e descrevemos um mecanismo até então inédito, onde temos um membro da família BTB/POZ, NAC1, atenuando a autorregulação negativa de BCL6. Por fim, potenciais novos alvos regulatórios do complexo NAC1/BCL6 também foram identificados. Dentre os alvos identificados, encontram-se diversas citocinas, como IL-6, IL-8 e CXCL2, todas já relacionadas com a progressão tumoral, seja por induzir fenótipos malignos nas células tumorais, seja por efeito regulatório da imunidade anti-tumoral.

Em relação ao segundo capítulo, mostrou-se que o tratamento com cisplatina por cinco dias levou ao aumento da resistência ao fármaco, bem como ao aumento do potencial migratório das células. Identificaram-se quatro mecanismos não excludentes que poderiam explicar a aquisição destes fenótipos. Primeiramente, identificou-se, que, em resposta ao tratamento, as células apresentam uma parada do ciclo celular em fase G2/M, a qual pode representar um mecanismo de resistência das células. Também verificou-se que, em resposta ao tratamento, há aumento da população de células com o fenótipo de CSC, as quais, sabe-se, contribuem para a iniciação, progressão e recidiva tumoral. Identificou-se ainda, o efeito de cisplatina, doxorubicina e paclitaxel na secreção de TGF- β 1 por células

derivadas de três subtipos histológicos de CAO. Viu-se que, de forma geral, a quimioterapia diminuiu a secreção da citocina pelas células, podendo representar um mecanismo de ação das drogas ainda não descrito. Por outro lado, a cisplatina induziu a secreção da citocina por células TOV21G, representativa do tipo histológico de células claras, sabidamente resistente à cisplatina. Este achado pode representar um mecanismo de resistência à cisplatina específico deste subtipo histológico. Por fim, viu-se que, em resposta ao tratamento com cisplatina, há regulação positiva da via CXCR2/CXCL2, como indicado pelo aumento da transcrição do primeiro e da secreção do segundo. Sabendo do papel já descrito desta via na indução de quimiorresistência, crescimento e metástase no câncer de mama, acredita-se que esta também pode ter efeito semelhante no CAO.

De forma geral, conseguimos, com este trabalho elucidar diferentes mecanismos celulares que podem contribuir para a progressão do CAO, trazendo evidências que permitem vislumbrar novas estratégias para combater a progressão do CAO.

14. PERSPECTIVAS

- Analisar o efeito de SB225002, um inibidor farmacológico de CXCR2, na quimiorresistência e migração de células expostas à cisplatina.
- Analisar o efeito de carboplatina na geração de CSC, secreção de TGF- β e CXCL2, e expressão de CXCR2 pelas células de CAOV.
- Analisar a expressão de marcadores de CSC e EMT em resposta ao tratamento com cisplatina.

REFERÊNCIAS

- AABO, G. K. et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer : four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. **British Journal of Cancer**, v. 78, n. October 1997, p. 1479–1487, 1998.
- ABHIMAN, S.; IYER, L. M.; ARAVIND, L. BEN: a novel domain in chromatin factors and DNA viral proteins. **Bioinformatics**, v. 24, n. 4, p. 458–61, 15 fev. 2008.
- ACHARYYA, S. et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 165–78, 6 jul. 2012.
- ACS. **Cancer Facts & Figures 2014**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2015.
- AEBI, S.; CASTIGLIONE, M. Epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 19 Suppl 2, n. Supplement 2, p. ii14–6, maio 2008.
- AL-ALWAN, L. A et al. Differential roles of CXCL2 and CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 5, p. 2731–41, 1 set. 2013.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. Ovarian Cancer. **Clinical Laboratory News**, v. 39, n. 3, 2013.
- AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–8, 1 abr. 2003.
- ALISON, M. R.; LIM, S. M. L.; NICHOLSON, L. J. Cancer stem cells: problems for therapy? **The Journal of Pathology**, v. 223, n. 2, p. 147–61, jan. 2011.
- BAPAT, S. A. Human ovarian cancer stem cells. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 33–41, jul. 2010.
- BEAULIEU, A. M.; SANT'ANGELO, D. B. The BTB-ZF family of transcription factors: key regulators of lineage commitment and effector function development in the immune system. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 6, p. 2841–7, 15 set. 2011.
- BJERKVIG, R. et al. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 11, p. 899–904, nov. 2005.
- BOLITHO, C. et al. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 4, p. 929–40, dez. 2010.

BOWTELL, D. D. L. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 11, p. 803–8, nov. 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BRUNEN, D. et al. TGF- β : an emerging player in drug resistance. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 12, n. 18, p. 2960–8, 15 set. 2013.

CALCAGNO, A. M. et al. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 21, p. 1637–52, 3 nov. 2010.

CHA, X. et al. NAC-1 , a Rat Brain mRNA , Is Increased in the Nucleus Accumbens Three Weeks after Chronic Cocaine Self-Administration. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 18, p. 6864–6871, 1997.

CHANG, C.-J. et al. Oct4-related cytokine effects regulate tumorigenic properties of colorectal cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 2, p. 245–51, 18 nov. 2011.

CHEN, H. et al. Enhancement of Cisplatin-Mediated Apoptosis in Ovarian Cancer Cells through Potentiating G2/M Arrest and p21 Upregulation by Combinatorial Epigallocatechin Gallate and Sulforaphane. **Journal of oncology**, v. 2013, p. 872957, jan. 2013.

CHENG, J.-C.; AUERSPERG, N.; LEUNG, P. C. K. TGF-beta induces serous borderline ovarian tumor cell invasion by activating EMT but triggers apoptosis in low-grade serous ovarian carcinoma cells. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42436, jan. 2012.

CHIN, A. R.; WANG, S. E. Cytokines driving breast cancer stemness. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 598–602, 25 jan. 2014.

CHORNOKUR, G. et al. Global ovarian cancer health disparities. **Gynecologic Oncology**, v. 129, n. 1, p. 258–64, abr. 2013.

CLARKE, M. F. et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. **Cancer research**, v. 66, n. 19, p. 9339–44, 1 out. 2006.

DAI, Q. et al. The BEN domain is a novel sequence-specific DNA-binding domain conserved in neural transcriptional repressors. **Genes & Development**, v. 27, n. 6, p. 602–14, 15 mar. 2013.

DAVIDSON, B. et al. Expression and clinical role of the bric-a-brac tramtrack broad complex/poxvirus and zinc protein NAC-1 in ovarian carcinoma effusions. **Human pathology**, v. 38, n. 7, p. 1030–6, jul. 2007.

EPIDEMIOLO, C. G. ON. Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 4, p. e1001200, jan. 2012.

FLAVELL, R. A. et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 8, p. 554–67, ago. 2010.

GABIZON, A. A. Pegylated Liposomal Doxorubicin : Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. **Cancer Investigation**, v. 19, n. 4, p. 424–436, 2001.

GAO, J. et al. TGF- β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 72, jan. 2014a.

GAO, M. et al. Identification of the NAC1-regulated genes in ovarian cancer. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 1, p. 133–40, 6 jan. 2014b.

GAO, M.; SHIH, I.-M.; WANG, T.-L. The role of forkhead box q1 transcription factor in ovarian epithelial carcinomas. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 13881–93, jan. 2012.

GARSON, K.; VANDERHYDEN, B. C. Epithelial ovarian cancer stem cells: underlying complexity of a simple paradigm. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 149, n. 2, p. R59–70, fev. 2015.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, jan. 2004.

GOTTESMAN, M. M. et al. Defeating Drug Resistance in Cancer. **Discovery Medicine**, v. 6, n. 31, p. 18–23, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HOLSCHNEIDER, C. H.; BEREK, J. S. **Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors** *Seminars in Surgical Oncology*, 2000. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-2337\(1993\)19:4<265::AID-AB2480190403>3.0.CO;2-P/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-2337(1993)19:4<265::AID-AB2480190403>3.0.CO;2-P/abstract)>

ICON2. ICON2 : randomised trial of single-agent carboplatin against three-drug combination of CAP (cyclophosphamide , doxorubicin , and cisplatin) in women with ovarian cancer. **The Lancet**, v. 352, p. 1571–1576, 1998.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. 2014. ed. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2014. p. 124

INFANGER, D. W. et al. Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche. **Cancer Research**, v. 73, n. 23, p. 7079–89, 1 dez. 2013.

ISHIBASHI, M. et al. A BTB/POZ gene, NAC-1, a tumor recurrence-associated gene, as a potential target for Taxol resistance in ovarian cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 10, p. 3149–55, 15 maio 2008.

ISHIKAWA, M.; NAKAYAMA, K. NAC1, a potential stem cell pluripotency factor expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 36, n. 5, p. 1097–1103, 24 mar. 2010.

JAGGUPILLI, A.; ELKORD, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 708036, jan. 2012.

JINAWATH, N. et al. NAC-1, a potential stem cell pluripotency factor, contributes to paclitaxel resistance in ovarian cancer through inactivating Gadd45 pathway. **Oncogene**, v. 28, n. 18, p. 1941–8, 7 maio 2009.

JONES, P. M.; DRAPKIN, R. Modeling High-Grade Serous Carcinoma: How Converging Insights into Pathogenesis and Genetics are Driving Better Experimental Platforms. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. August, p. 217, jan. 2013.

JONES, S. et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 228–31, 8 out. 2010.

KAKU, T. et al. Histological classification of ovarian cancer. **Medical Electron Microscopy**, v. 36, n. 1, p. 9–17, mar. 2003.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1776–1784, 15 dez. 2003.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–8, jun. 2009.

KELEMEN, L. E.; KÖBEL, M. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemma. **The Lancet. Oncology**, v. 12, n. 11, p. 1071–80, out. 2011.

KIM, J. et al. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 10, p. 3921–6, 6 mar. 2012.

KONG, D. et al. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 716–29, 21 fev. 2011.

KOOB, G. Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. **Neuron**, v. 16, p. 893–896, 1996.

KORUTLA, L. et al. NAC1, a POZ/BTB protein that functions as a corepressor. **Neurochemistry international**, v. 54, n. 3-4, p. 245–52, 2009.

KUMAR, A. et al. Tissue transglutaminase promotes drug resistance and invasion by inducing mesenchymal transition in mammary epithelial cells. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13390, jan. 2010.

KUO, K.-T. et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1597–601, maio 2009.

KURIAN, A. W. et al. Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they different risk factors? **Gynecologic Oncology**, v. 96, n. 2, p. 520–30, fev. 2005.

LAIOS, A. et al. An integrative model for recurrence in ovarian cancer. **Molecular Cancer**, v. 7, p. 8, jan. 2008.

LAMBERT, H.; BERRY, R. High dose cisplatin compared with high dose cyclophosphamide in the management of advanced epithelial ovarian cancer (FIGO stages III and IV): report from the. **British Medical Journal**, v. 290, n. March, p. 889–893, 1985.

LATIFI, A. et al. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 10, p. 2850–64, out. 2011.

LEE, Y. et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. **The Journal of Pathology**, v. 211, n. 1, p. 26–35, jan. 2007.

LEVANON, K. et al. Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1103–13, 25 fev. 2010.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, jan. 2007.

LISTER-SHARP, D. et al. Rapid review effectiveness and cost-effectiveness of the taxanes used in the treatment of advanced breast and ovarian cancer. **Health Technology Assessment**, v. 4, n. 17, 2000.

LOGARAJAH, S. et al. BCL-6 is expressed in breast cancer and prevents mammary epithelial differentiation. **Oncogene**, v. 22, n. 36, p. 5572–8, 28 ago. 2003.

LUNDHOLM, L. et al. Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. **Cell death & disease**, v. 4, p. e478, jan. 2013.

MA, L. et al. Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 9, p. 593–602, set. 2010.

MACKLER, S. et al. Requirement for the POZ/BTB protein NAC1 in acute but not chronic psychomotor stimulant response. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 1, p. 48–55, 11 fev. 2008.

MAIURI, M. C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 741–52, set. 2007.

MASSAGUÉ, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 215–30, 25 jul. 2008.

MCGUIRE, W. P.; MARKMAN, M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. **British Journal of Cancer**, v. 89 Suppl 3, p. S3–8, dez. 2003.

MEIRELLES, K. et al. Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 7, p. 2358–63, 14 fev. 2012.

MENDEZ, L. M. et al. CtBP is an essential corepressor for BCL6 autoregulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 7, p. 2175–86, abr. 2008.

MENG, E. et al. CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. **Clinical & experimental metastasis**, v. 29, n. 8, p. 939–48, dez. 2012.

NAKAYAMA, K. et al. A BTB/POZ protein, NAC-1, is related to tumor recurrence and is essential for tumor growth and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 49, p. 18739–44, 5 dez. 2006.

NAKAYAMA, K. et al. NAC-1 controls cell growth and survival by repressing transcription of Gadd45GIP1, a candidate tumor suppressor. **Cancer research**, v. 67, n. 17, p. 8058–64, 1 set. 2007.

NAKAYAMA, K. et al. Biological role and prognostic significance of NAC1 in ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 3, p. 469–78, dez. 2010.

NCI. **SEER Stat Fact Sheets : Breast Cancer How Many People Survive 5 Years Or More after Being Diagnosed with Breast**. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>>.

NIERO, E. L. et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, p. 37, jan. 2014.

NOSSOV, V. et al. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 199, n. 3, p. 215–23, set. 2008.

OFT, M.; HEIDER, K.; BEUG, H. TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. **Current Biology**, v. 8, n. 23, p. 1243–1252, nov. 1998.

OLIVER H. LOWRY, NIRA J. ROSEBROUGH, A. L. F. AND R. J. R. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 27 ago. 1951.

OZOLS, R. F. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. **Annals of Oncology**, v. 17, n. Supplement 5, p. v181–7, maio 2006.

PAES, M. 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.

PEREZ-TORRADO, R.; YAMADA, D.; DEFOSSEZ, P.-A. Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. **BioEssays ental biology**, v. 28, n. 12, p. 1194–202, dez. 2006.

PERO, R. et al. POZ-, AT-hook-, and zinc finger-containing protein (PATZ) interacts with human oncogene B cell lymphoma 6 (BCL6) and is required for its negative autoregulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18308–17, 25 maio 2012.

PIEK, J. M. et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. **The Journal of Pathology**, v. 195, n. 4, p. 451–6, nov. 2001.

PONTI, D. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. **Cancer research**, v. 65, n. 13, p. 5506–11, 1 jul. 2005.

RICARDO, S. et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, p. 937–946, 2011.

SCHÜLER, S. et al. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 287, n. 6, p. 1187–204, jun. 2013.

SENA, P. et al. Morphological and quantitative analysis of BCL6 expression in human colorectal carcinogenesis. **Oncology reports**, v. 31, n. 1, p. 3892, 13 nov. 2013.

SERUGA, B.; OCANA, A.; TANNOCK, I. F. Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 8, n. 1, p. 12–23, jan. 2011.

SHAH, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Cell Cycle-mediated Drug Resistance : An Emerging Concept in Cancer Therapy Cell Cycle-mediated Drug Resistance : An Emerging Concept in. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 2168–2181, 2001.

SHARMA, B. et al. Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 5, p. 799–808, maio 2013.

SHEN, H. et al. Two 4N cell-cycle arrests contribute to cisplatin-resistance. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e59848, jan. 2013.

SHERMAN-BAUST, C. A et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Cancer Cell**, v. 3, n. 4, p. 377–86, abr. 2003.

SHI, M. F. et al. Identification of cancer stem cell like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line Concepts found in this article Explore content Open Relationship. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 22, p. 3915–3925, 2010.

SHIH, I.-M. et al. Amplification of the ch19p13.2 NACC1 locus in ovarian high-grade serous carcinoma. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 24, n. 5, p. 638–45, maio 2011.

SHIH, I.-M.; DAVIDSON, B. Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. **Future oncology (London, England)**, v. 5, n. 10, p. 1641–1657, 2009.

SHIH, I.-M.; KURMAN, R. J. Ovarian Tumorigenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1511–1518, maio 2004.

SIEGEL, P. M.; MASSAGUÉ, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807–21, nov. 2003.

SORENSEN, C. M.; EASTMAN, A. Mechanism of cis -Diamminedichloroplatinum (II) -induced Cytotoxicity : Role of G 2 Arrest and DNA Double-Strand Breaks Mechanism of cw-Diamminedichloroplatinum (II) -induced Cytotoxicity : Role of G2. **Cancer Research**, v. 48, p. 4484–4488, 1988.

SOSLOW, R. 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. 14, p. 161–174, 2008.

SOUZA, M. C. et al. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, 1 mar. 2013.

STEAD, M. A.; CARR, S. B.; WRIGHT, S. C. Structure of the human Nac1 POZ domain. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, v. 65, n. Pt 5, p. 445–9, 1 maio 2009.

TANG, D. et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 5, p. 881–892, 2010.

THIAVILLE, M. M. et al. Identification of PBX1 target genes in cancer cells by global mapping of PBX1 binding sites. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e36054, jan. 2012.

USHIJIMA, K. Treatment for recurrent ovarian cancer-at first relapse. **Journal of oncology**, v. 2010, n. di, p. 497429, 2010.

VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 226–44, 28 ago. 2008.

VAUGHAN, S. et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 10, p. 719–25, out. 2011.

WAGNER, J. M.; KARNITZ, L. M. Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival □. p. 208–214, 2009.

WANG, J. et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 364–8, 16 nov. 2006.

WANG, X. et al. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 15018–23, 12 nov. 2002.

WANG, Y. et al. BCL6 is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in ovarian cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 1, p. 255–266, 2015.

WASSERMAN, W. W.; SANDELIN, A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. **Nature Reviews. Genetics**, v. 5, n. 4, p. 276–87, abr. 2004.

WICHA, M. S.; LIU, S.; DONTU, G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 1883–90; discussion 1895–6, 15 fev. 2006.

WIEGAND, K. C. et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 16, p. 1532–43, 14 out. 2010.

XU, J.; LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 156–72, fev. 2009.

YAP, K. L. et al. NAC1 is an actin-binding protein that is essential for effective cytokinesis in cancer cells. **Cancer research**, v. 72, n. 16, p. 4085–96, 15 ago. 2012.

YAP, K. L. et al. Loss of NAC1 expression is associated with defective bony patterning in the murine vertebral axis. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e69099, jan. 2013.

YE, B. et al. Cloning of bcl-6, the Locus Involved in Chromosome Translocations Affecting Band 3q27 in B-Cell Lymphoma. **Cancer Research**, v. 53, n. 12, p. 2732–2735, 1993.

YE BH, LISTA F, LO COCO F, KNOWLES DM, OFFIT K, CHAGANTI RS, D.-F. R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 262, n. 5134, p. 747–50, 1993.

YEASMIN, S. et al. Biological and clinical significance of NAC1 expression in cervical carcinomas: a comparative study between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas. **Human pathology**, v. 43, n. 4, p. 506–19, abr. 2012.

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, n. 3, p. 554–62, 1 fev. 2011.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1429–37, jun. 2009.

ZEPERNICK, F.; MEINHOLD-HEERLEIN, I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 290, n. 5, p. 839–42, 1 nov. 2014.

ZHANG, Y. et al. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response. **Oncogene**, v. 31, n. 8, p. 1055–64, 23 fev. 2012a.

ZHANG, Y. et al. Dysfunction of nucleus accumbens-1 activates cellular senescence and inhibits tumor cell proliferation and oncogenesis. **Cancer research**, v. 72, n. 16, p. 4262–75, 15 ago. 2012b.

ZHAO, X. et al. MicroRNA-127 is Downregulated by Tudor-SN Protein and Contributes to Metastasis and Proliferation in Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, v. 296, n. 12, p. 1842–9, dez. 2013.