



Universidade de Brasília

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TERAPIA MULTIMODAL PARA TRATAMENTO DE
CÂNCER COLORRETAL RESISTENTE À QUIMIOTERAPIA**

Amanda Alencar Cabral Morais

**Brasília
2023**

Amanda Alencar Cabral Morais

Terapia multimodal para tratamento de câncer colorretal resistente à quimioterapia

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração: Materiais nanoestruturados biocompatíveis.

Orientador: Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

**Brasília
2023**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

À minha família pela compreensão e apoio.

Em especial, ao meu esposo José A. V. Morais.

AGRADECIMENTOS

Jamais poderia finalizar essa tese sem agradecer as pessoas que foram essenciais na construção desse trabalho, pois é impossível fazer ciência sozinho. Portanto, presto aqui minha gratidão.

Ao meu estimado orientador, Dr. Ricardo Bentes, que confiou desde o início na minha capacidade para essa missão, dando todo o suporte necessário para construção desse trabalho. É não só um orientador, mas um amigo que eu espero que se faça presente em minha vida para além da pesquisa, para além do fim desse trabalho.

Ao meu parceiro e esposo, José Athayde, que sacrificou todos os sábados, domingos, feriados, que duplicou sua jornada de trabalho em um único dia para me acompanhar em todas as vezes que precisei ir fora do horário comercial fazer experimento, sempre pensando na minha segurança e bem estar. Prometo que daqui para a frente compensaremos todas as horas extras.

Aos professores do Departamento de Biologia Molecular da UnB, Dra. Andrea Q. Maranhão e o Dr. Marcelo de M. Brigido, bem como aos seus alunos, os doutorandos Renato K. A. de O. França e Pedro H. A. Barros. Sem a parceria de vocês não seria possível executar toda a parte molecular dessa pesquisa. Agradeço todas as reuniões, orientações e ensinamentos.

À professora Dra. Patrícia Bento por todo o suporte de perto e de longe.

Aos alunos de PIBIC, Karina e Ygor, com os quais tive o prazer de executar a parte inicial dessa pesquisa, ensinando os primeiros passos no cultivo de células. Vocês foram essenciais em um momento crucial da minha vida. Obrigada, meninos.

Aos amigos da pós que foram meu suporte emocional e ombros para desabafo: Rayane Ganassin, Henrique Loback, Camila Cardador, entre outros.

À todos os professores do Departamento de Genética e Morfologia que cederam algum material ou equipamento essencial para realização desse trabalho, em especial: João Paulo, Luiz Muehlmann, Laise Andrade, Graziella Joanitti e César Koppe.

Às estimadas coordenadoras do PPG BioAni, Dra. Daniela Mara e Dra. Mônica Garcia, que sempre buscaram apoiar com todas as dúvidas, bem como na divulgação dos recursos disponíveis.

À todos que de um modo geral torceram por mim de alguma forma.

Às agências de fomento pelas bolsas de doutorado recebidas no decorrer desse tempo, CAPES – Código de financiamento 001) e CNPq. Assim como a chamada universal 2018 MCTIC/CNPq (429060/2018-1), que financiou a execução desse projeto.

EPÍGRAFRE

你不努力 谁也给不了你想要的生活。

Se você não trabalhar duro, ninguém pode te dar a vida que você quer.

Autor: Zhang Xiaoheng

RESUMO

Introdução: A aquisição de resistência a quimioterapia é um grande desafio na terapia anticâncer. Apesar de ser utilizada como o tratamento de primeira linha para tumores colorretais (CRC) avançados ou metastáticos, o desenvolvimento de resistência à oxaliplatina (L-OHP) é um problema que acomete 40% dos pacientes tratados e está relacionado à baixa taxa de sobrevivência desses pacientes. **Objetivo:** Analisar o efeito combinado de curcumina livre (CURC) ou nanopartículas lipídicas sólidas com curcumina (NLSC), terapia fotodinâmica (TFD) mediada por alumínio-cloro ftalocianina (NE-AIClFt) em nanoemulsão, para melhorar a resposta da L-OHP no tratamento de uma linhagem de CRC L-OHP-resistente, visando reverter o perfil de resistência e sensibilizar as células à quimioterapia com L-OHP. **Métodos:** O ensaio de citotoxicidade (MTT) foi utilizado para determinar a concentração de L-OHP necessária para matar 50% (IC₅₀) das células da linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT116-S). A linhagem HCT116 resistente à L-OHP (HCT116-R) foi estabelecida por meio da exposição a concentrações crescentes de L-OHP até o valor de 10x o IC₅₀. Ao final, as linhagens HCT116-S e HCT116-R foram caracterizadas quanto ao tempo de duplicação, taxa de crescimento, capacidade de formar esferas tumorais e análise do ciclo/morte por citometria de fluxo. Foi determinado o IC₅₀ para os tratamentos CURC, NLSC e TFD, seguido da análise de sinergismo de cada combinação terapêutica. As combinações terapêuticas foram avaliadas quanto ao efeito na viabilidade celular, capacidade clonogênica, capacidade migratória, perfil de morte celular e expressão gênica. **Resultados:** A linhagem HCT116-R foi estabelecida em 11 meses, apresentando IC₅₀ para L-OHP significativamente diferente da linhagem original (2,7±0,3 µM e 26,6±1,5 µM para HCT116-S e HCT116-R, respectivamente). Quando comparada com HCT116-S, as células HCT116-R apresentaram mudanças significativas na taxa de crescimento e na capacidade de formar esferas tumorais. O valor de IC₅₀ obtido para cada tratamento foi: HCT116-S= (CURC): 7,2±0,6 µM; (NLSC): 7,1±1,3 µM; e (TFD): 4,4±0,2 µM; para a linhagem HCT116-R= (CURC): 5,1±0,8 µM; (NLSC): 9,4±0,6 µM; e (TFD): 5,3±0,1 µM. O ensaio de efeito sinérgico mostrou uma dose-dependência em ambas as linhagens, sendo escolhida a combinação terapêutica: pré-tratamento com TFD [IC₅₀], seguido da exposição à L-OHP [½ do IC₅₀] e CURC [IC₅₀]. O tratamento combinatório foi eficaz quanto à redução da viabilidade celular, capacidade clonogênica e capacidade migratória. HCT116-R tratadas com L-OHP+CURC e TFD+L-OHP+CURC apresentaram maior tendência de morte por necrose. As células HCT116-R tiveram redução na expressão de genes envolvidos em vias relacionadas a transcrição e regulação da expressão gênica, no entanto, quando tratadas, houve um aumento da expressão dos genes envolvidos nessas vias. Um total de 20 genes candidatos foram selecionados para validação futura por RT-qPCR, os quais se relacionam principalmente com a atividade de p53, resposta a dano celular, e desenvolvimento tumoral. **Conclusões:** As características observadas para a linhagem HCT116-R são consistentes com o perfil de resistência. O tratamento multimodal TFD+L-OHP+CURC é eficaz para melhorar o efeito da L-OHP, mesmo utilizando uma concentração baixa do quimioterápico, possibilitando manter a eficácia terapêutica, sem necessidade de aumentar a concentração de L-OHP, trazendo perspectiva futura de redução de efeito tóxicos comumente associados a utilização da L-OHP.

Palavras-chave: CRC, linhagem resistente à drogas, HCT116, quimiorresistência, L-OHP, terapia multimodal, curcumina, TFD, nanotecnologia.

ABSTRACT

Introduction: Acquiring a chemoresistance profile is one of the biggest challenges in anticancer therapy. Despite being used as the first-line treatment for advanced/metastatic colorectal cancer (CRC), the development of oxaliplatin (L-OHP) resistance is a problem that affects 40% of treated patients and is related to a low survival rate among these patients. **Objective:** To analyze the combined effect of free curcumin (CURC) or solid lipid nanoparticles with curcumin (NLSC), and photodynamic therapy (PDT) mediated by the aluminum-chlorine phthalocyanine nanoemulsion (NE-AIPcCl) to improve the response of L-OHP against a chemoresistant CRC cell line. Aiming to reverse the resistance profile and sensitize the cells to chemotherapy with L-OHP. **Methods:** The cytotoxicity assay (MTT) was used to determine the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of L-OHP against human colorectal carcinoma cell line (HCT116-S). The L-OHP-resistant HCT116 cell line (HCT116-R) was established by exposing it to increasing concentrations of L-OHP up to 10 times the IC_{50} value. Subsequently, the HCT116-S and HCT116-R cell lines were characterized in terms of doubling time, growth rate, ability to form tumor spheres, and cycle/death analysis by flow cytometry. The IC_{50} values for CURC, NLSC, and PDT treatments were determined, followed by the analysis of synergy for each therapeutic combination. The effect of therapeutic combinations was evaluated in terms of cell viability, clonogenic capacity, migratory capacity, cell death profile and gene expression. **Results:** The HCT116-R cell line was established in 11 months and showed a significantly different IC_{50} value for L-OHP ($2.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ and $26.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$ for HCT116-S and HCT116-R, respectively). When compared to HCT116-S, HCT116-R cells showed significant changes in growth rate and ability to form tumor spheres. The IC_{50} value obtained for each treatment was: HCT116-S= (CURC): $7.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$; (NLSC): $7.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$; e (TFD): $4.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$; for strain HCT116-R= (CURC): $5.1 \pm 0.8 \mu\text{M}$; (NLSC): $9.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$; e (TFD): $5.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$. The synergy test showed a dose-dependence for both cell lines, the therapeutic combination chosen was pre-treatment with PDT [IC_{50}], followed by exposure to L-OHP [$\frac{1}{2}$ of IC_{50}] and CURC [IC_{50}]. The combinatorial treatment proved to be effective in terms of reducing cell viability, clonogenic capacity, and migratory capacity. HCT116-R treated with L-OHP+CURC and PDT+L-OHP+CURC showed a higher tendency to die from necrosis. When compared with HCT116-S cells, the HCT116-R cells showed reduced expression of genes involved in pathways related to transcription and regulation of gene expression. However, when treated, there was an increase in the expression of genes involved in these pathways. A total of 20 candidate genes related to p53 activity, cell damage response, and tumor development were chosen for further validation by RT-qPCR according to the general function described in the literature. **Conclusions:** The observed characteristics of the HCT116-R cells are consistent with the resistance profile. The multimodal treatment PDT+L-OHP+CURC is effective in improving the efficacy of L-OHP, even when using a low concentration of the chemotherapeutic agent. This approach allows for the maintenance of therapeutic efficacy without the need to increase the concentration of L-OHP, thereby offering a promising prospect for reducing the toxic effects commonly associated with its use.

Keywords: CRC, drug-resistant cell lines, HCT116, chemoresistance, L-OHP, multimodal therapy, curcumin, PDT, nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Classificação do câncer colorretal por meio do consenso de subtipos moleculares (CMS, do inglês: consensus molecular subtypes)..... | 18 |
| Figura 2 – Estrutura da oxaliplatina. | 19 |
| Figura 3 – Estrutura química da curcumina. | 22 |
| Figura 4 – Ação da terapia fotodinâmica sobre células tumorais..... | 25 |
| Figura 5 – Alumínio cloro ftalocianina..... | 27 |
| Figura 6 – Fluxograma experimental descrevendo os ensaios realizados..... | 30 |
| Figura 7 – Mecanismos de ação do kit RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, Madison, WI, EUA)..... | 40 |
| Figura 8 – Análise de viabilidade da linhagem HCT116-S após exposição à L-OHP por 48 horas para determinação do IC50..... | 45 |
| Figura 9 – Fotomicrografia das células HCT116-S (A) e HCT116-R (B)..... | 46 |
| Figura 10 – Análise de viabilidade após o estabelecimento da linhagem resistente por exposição gradual de L-OHP..... | 46 |
| Figura 11 – Análise do crescimento celular..... | 47 |
| Figura 12 – Análise do crescimento celular em tempo real com exposição contínua a L-OHP..... | 48 |
| Figura 13 – Análise de crescimento em tempo real com exposição à L-OHP por 48 horas..... | 49 |
| Figura 14 – Ensaio de formação de esferas..... | 50 |
| Figura 15 – Análise de morte celular por citometria de fluxo..... | 51 |
| Figura 16 – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo..... | 53 |
| Figura 17 – Determinação da concentração inibitória para 50% das células de cada tratamento individualmente..... | 54 |
| Figura 18 – Taxa de inibição 48 horas após exposição à diferentes combinações terapêuticas, utilizando concentrações 0,25x(IC50), 0,5(IC50), IC50, 2x(IC50) e 4x(IC50) de cada tratamento..... | 56 |
| Figura 19 – Valores obtidos de índice de combinação após as diferentes combinações terapêuticas para as linhagens HCT116-S e HCT116-R..... | 57 |
| Figura 20 – Ensaio de viabilidade celular após 48 horas..... | 60 |
| Figura 21 – Ensaio de formação de colônias..... | 61 |
| Figura 22 – Ensaio de migração celular..... | 62 |
| Figura 23 – Fotomicrografias representando o ensaio de migração celular para a células HCT116-S..... | 63 |
| Figura 24 – Fotomicrografias representando o ensaio de migração celular para a células HCT116-R..... | 64 |
| Figura 25 – Ensaio de migração em tempo real. (A) Migração em tempo real da linhagem HCT116-S..... | 66 |
| Figura 26 – Ensaio de morte celular em tempo real das linhagens HCT116-S e HCT116-R quanto expostas aos tratamentos por 48 horas utilizando o kit RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis..... | 67 |
| Figura 27 – Heatmap evidenciando as semelhanças e diferenças entre as duplicatas das amostras S_CTRL, R_CTRL e R_Triplicata utilizadas na análise de RNAseq..... | 69 |
| Figura 28 – Volcano plot dos DEGs obtidos por meio da análise do transcriptoma por RNAseq..... | 70 |
| Figura 29 – Diagrama de Venn dos DEGs mais significativos ($\log_2FC \leq -1$ e ≥ 1 , $P\text{-value} < 0,05$) evidenciando os genes comuns e exclusivos para os diferentes comparativos realizados..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Figura 30 – Enriquecimento de processos biológicos com base na análise de Gene Ontology (GO) a fim de entender as vias nas quais os DEGs estão envolvidos..... | 72 |
| Figura 31 – Análise de enriquecimento representando um estado ou processo biológico definido para os genes diferencialmente expressos..... | 78 |
| Figura 32 – Resumo geral dos resultados observados..... | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Combinações terapêuticas escolhidas para utilização com cada linhagem nos ensaios subsequentes obtidas por meio da análise de efeito sinérgico, conforme disposto na sessão de resultados..... | 37 |
| Tabela 2 – Resumo dos principais dados obtidos com o ensaio de sinergismo por meio do software livre CompuSyn..... | 58 |
| Tabela 3 – Caracterização do RNA total..... | 68 |
| Tabela 4 – Genes candidatos para validação posterior por RT-qPCR..... | 74 |
| Tabela 5 – Lista dos dez principais termos relacionados aos genes diferencialmente expressos analisados por meio plataforma Enrich R..... | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| 3D | tridimensional |
| ABCB1 | ATP binding cassette subfamily B member 1 |
| ABCC1 | gene que codifica MRP |
| ABCG2 | gene que codifica BCRP |
| ANOVA | análise de variância |
| ATP | trifosfato de adenosina |
| AUC | Área sob a curva (do inglês: <i>area under the curve</i>) |
| BAX | BCL2 associated X, apoptosis regulator |
| BCRP | <i>breast cancer resistance protein</i> |
| CDKN1A | cyclin dependent kinase inhibitor 1A |
| cDNA | DNA complementar |
| CI | índice de combinação |
| CRC | <i>colorectal cancer</i> |
| CURC | curcumina livre |
| CYP24A1 | cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 |
| DCLK1 | doublecortin like kinase 1 |
| DEGs | do inglês: differentially expressed genes |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>) |
| DP | desvio padrão |
| DPEP1 | dipeptidase 1 |
| EP | eficiência de plaqueamento |
| EPM | Erro Padrão da Média |
| ERCC1 | <i>excision repair cross-complementation group 1</i> |
| FC | do inglês fold-change |
| FDR | do inglês False discovery rate |
| FITC | isotiocianato de fluoresceína |
| FOXA2 | forkhead box A2 |
| FS | fotossensibilizante |
| GCNT3 | glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin typ |
| GO | gene ontology |
| GRHL3 | grainyhead like transcription factor 3 |
| GSEA | Gene Set Enrichment Analysis |
| HCT116 | linhagem celular de carcinoma colorretal humano |
| HCT116-R | linhagem de carcinoma colorretal resistente |
| HCT116-S | linhagem de carcinoma colorretal sensível |
| HNF1B | HNF1 homeobox B |
| IC | índice celular |
| IC ₅₀ | concentração inibitória para 50% das células |
| ICAM1 | intercellular adhesion molecule 1 |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |

| | |
|------------------|--|
| KLK5 | kallikrein related peptidase 5 |
| L-OHP | trans-L-diaminociclohexano oxalatoplatino |
| LED | diodo emissor de luz com 25,9 j/cm ² |
| LoVo | linhagem celular de carcinoma de colon humano |
| MDR | <i>multidrug resistance</i> |
| MDR1/ABCB1 | gene que codifica P-gp |
| MMP7 | matrix metallopeptidase 7 |
| MRP | proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas |
| MTT | brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio |
| N-Pt-N | ligação entre os átomos de nitrogênio e platina |
| NE-AICIFt | nanoemulsão contendo o fotosensibilizante alumínio cloro ftalocianina |
| NF-κB | fator nuclear kappa B |
| NLSC | nanopartículas lipídicas sólidas com curcumina |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| P-gp | glicoproteína-P |
| PBS | tampão fosfato salina |
| PDI | índice de polidispersão |
| PI | iodeto de propídeo |
| PRUNE2 | prune homolog 2 with BCH domain |
| RFU | do inglês <i>relative fluorescence units</i> |
| RIN | do inglês RNA <i>integrity number</i> |
| RKO | linhagem celular de carcinoma de colon humano |
| RLU | do inglês <i>relative light units</i> |
| RNA | ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>) |
| RNA _m | ácido ribonucleico mensageiro |
| RNAseq | do inglês RNA sequencing |
| ROS | espécies reativas do oxigênio |
| RT-qPCR | transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês <i>Reverse transcription quantitative real time polymerase chain reaction</i>) |
| RTCA | real time cell analyzer |
| seq | sequenciamento |
| SFB | soro fetal bovino |
| sgRNA | <i>single guide RNA</i> |
| SLC12A5 | Solute carrier family 12 member 5 |
| STEAP4 | STEAP4 metalloredutase |
| SW620 | linhagem celular de carcinoma de colorretal humano |
| TESC | Tescalcin |
| TFD | terapia fotodinamica |
| TP53I3 | tumor protein p53 inducible protein 3 |
| TUSC3 | tumor suppressor candidate 3 |
| UV | ultravioleta |
| vol | volume |
| WNT7A | wingless-type MMTV integration site family, member 7A |

wt

weight

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| % | porcentagem |
| °C | graus celsius |
| < | menor |
| > | maior |
| ≤ | Menor que ou igual a |
| ≥ | Maior que ou igual a |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| J/cm ² | Joule por centímetro quadrado |
| mg | miligramas |
| mL | mililitros |
| mV | milivolt |
| mM | milimolar |
| nm | nanômetros |
| O ₂ | oxigênio |
| μg | microgramas |
| μL | microlitros |
| μM | micromolar |
| μm | micrometros |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. | OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 2.1. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 3.1. | CULTIVO CELULAR..... | 30 |
| 3.2. | ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM TUMORAL RESISTENTE..... | 30 |
| 3.3. | CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM RESISTENTE..... | 31 |
| 3.3.1. | TEMPO DE DUPLICAÇÃO | 31 |
| 3.3.2. | ANÁLISE DO CRESCIMENTO EM TEMPO REAL..... | 32 |
| 3.3.3. | ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS NA PRESENÇA DE OXALIPLATINA – CULTIVO 3D..... | 32 |
| 3.3.4. | MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 33 |
| 3.3.5. | ANÁLISE DO CICLO E FRAGMENTAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 34 |
| 3.4. | DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA PARA 50% DAS CÉLULAS TRATADAS COM CURCUMINA LIVRE, NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA CONTENDO CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA..... | 34 |
| 3.5. | ENSAIOS COMBINATÓRIOS..... | 36 |
| 3.5.1. | ANÁLISE DO EFEITO SINÉRGICO..... | 36 |
| 3.5.2. | ENSAIO DE VIABILIDADE..... | 37 |
| 3.5.3. | ENSAIO CLONOGÊNICO..... | 37 |
| 3.5.4. | ENSAIO DE MIGRAÇÃO – SCRATCH ASSAY..... | 38 |
| 3.5.5. | ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM TEMPO REAL..... | 38 |
| 3.5.6. | ENSAIO DE MORTE CELULAR EM TEMPO REAL..... | 39 |
| 3.5.7. | ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA..... | 41 |
| 3.5.7.1. | EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RNA TOTAL..... | 41 |
| 3.5.7.2. | ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA POR RNA-SEQ..... | 41 |
| 3.5.7.2.1. | ANÁLISE DOS DEGs PARA ESCOLHA DE GENES CANDIDATOS PARA VALIDAÇÃO POSTERIOR POR RT-qPCR..... | 43 |
| 3.6. | ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 44 |
| 4. | RESULTADOS..... | 45 |

| | |
|---|------------|
| 4.1. ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM CELULAR RESISTENTE À OXALIPLATINA..... | 45 |
| 4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA PARA 50% DAS CÉLULAS..... | 53 |
| 4.3. ENSAIOS COMBINATÓRIOS..... | 55 |
| 4.3.1. ANÁLISE DO EFEITO SINÉRGICO..... | 55 |
| 4.3.2. ENSAIO DE VIABILIDADE..... | 60 |
| 4.3.3. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNICAS..... | 61 |
| 4.3.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO – SCRATCH ASSAY..... | 61 |
| 4.3.5. ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM TEMPO REAL..... | 64 |
| 4.3.6. ENSAIO DE MORTE CELULAR EM TEMPO REAL..... | 66 |
| 4.3.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA..... | 68 |
| 4.3.7.1. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RNA TOTAL..... | 68 |
| 4.3.7.2. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA POR RNAseq..... | 68 |
| 4.3.7.2.1. ANÁLISE DOS DEGs PARA ESCOLHA DE GENES CANDIDATOS PARA VALIDAÇÃO POSTERIOR POR RT-qPCR..... | 73 |
| 5. DISCUSSÃO | 79 |
| 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 92 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 93 |
| ANEXO I – Artigo publicado com o título “Establishment and characterization of oxaliplatin-resistant human colorectal cancer cell line”..... | 110 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CRC, do inglês: *colorectal cancer*) é uma doença multifatorial do trato digestivo que acomete a região do colón e/ou do reto, e pode ser influenciada tanto por fatores genéticos (hereditários), quanto por fatores relacionados ao estilo de vida, como má alimentação, consumo de álcool, sedentarismo e obesidade (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015; BINEFA *et al.*, 2014a; BRAY *et al.*, 2018; BRENNER; KLOOR; POX, 2014; SEDLAK; YILMAZ; ROPER, 2023).

De acordo com a última estimativa feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o ano de 2020, foi previsto cerca de 1.931.590 novos casos e cerca de 935.173 mortes relacionadas ao CRC, sendo, entre todos os cânceres, o terceiro mais incidente e o segundo em termos de mortalidade em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2021).

A estimativa de câncer no Brasil emitida pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA/MS) prevêem para o triênio 2023-2025 a ocorrência de 483 mil novos casos de câncer (excluindo os dados de câncer de pele não melanoma), destes o CRC representa 46 mil novos casos (6,5%). Sendo, o segundo mais incidente em homens com 22 mil casos (6,4%) e em mulheres com 24 mil (6,5%). Ainda de acordo com o INCA/MS, foram registrados em 2020 cerca de 20.245 óbitos em decorrência de CRC (INCA, 2022; SANTOS *et al.*, 2023).

É importante mencionar que os números estimados para CRC são ainda maiores quando consideramos o impacto da pandemia da COVID-19, como exposto nos trabalhos de KOPEL *et al.* (2022) e MAZIDIMORADI *et al.* (2023), onde os autores trazem a questão do isolamento social ao longo do planeta, que fez com que programas de triagem de CRC tivessem que ser interrompidos, impactando diretamente no possível diagnóstico e tratamento oportuno.

O CRC é classificado por meio de um consenso de subtipos moleculares (CMS, do inglês: *consensus molecular subtypes*) dividido em 4 diferentes subtipos, baseado em suas características moleculares (GUINNEY *et al.*, 2015; MENTER *et al.*, 2019), conforme descrito na Figura 1. Essas definições são importantes para entender as melhores estratégias terapêuticas para cada situação.

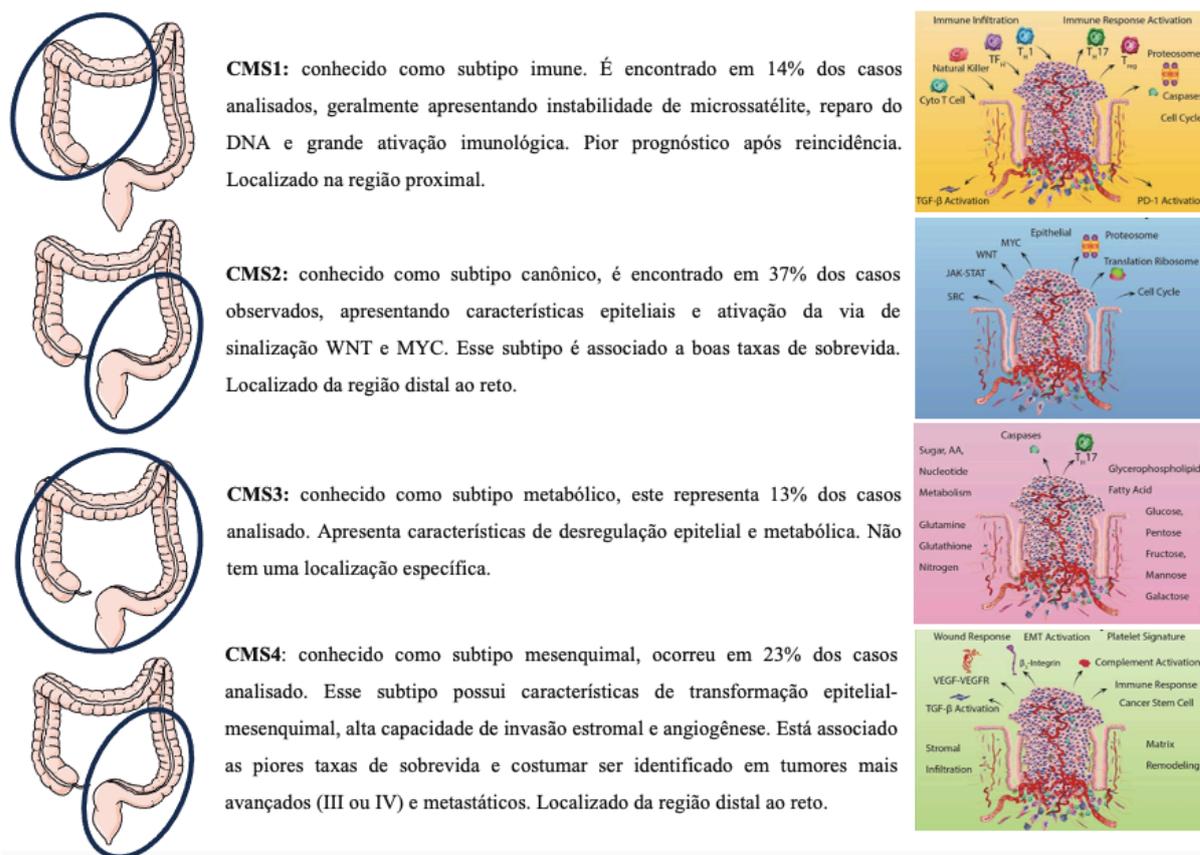


Figura 1 - Classificação do câncer colorretal por meio do consenso de subtipos moleculares (CMS, do inglês: consensus molecular subtypes). O círculo azul representa a região do intestino na qual o subtipo é mais frequentemente encontrado. Adaptado de MENTER *et al.* (2019).

O tratamento padrão para CRC é composto por cirurgia para remoção mecânica de pólipos ou tumores e pode ser associado a regimes sistêmicos de quimioterapia e/ou radioterapia, seja antes (neoadjuvante) ou após sua remoção (adjuvante) (CONDE *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2016a; MA *et al.*, 2023; YU; CHEUNG, 2018). Dependendo do estágio do câncer, outras terapias podem ser combinadas para um tratamento mais direcionado, como no caso de pacientes com CRC avançado ou metastático, onde pode-se empregar uma imunoterapia direcionada ao perfil molecular do tumor ou outros tratamentos complementares (AL BITAR *et al.*, 2023; MODEST; PANT; SARTORE-BIANCHI, 2019; YU; CHEUNG, 2018; ZHENG; ZHOU; TONG, 2015).

A quimioterapia é sem dúvidas uma das estratégias mais comumente empregadas no tratamento do CRC, sendo muito utilizada como terapia adjuvante após remoção mecânica em tumores avançados (MA *et al.*, 2023; MODEST; PANT; SARTORE-BIANCHI, 2019). Ao longo do tempo, diferentes quimioterápicos têm sido utilizados no tratamento do CRC, os quais costumam ser combinados para potencialização do efeito terapêutico e melhoria da sobrevida

dos pacientes, dentre os mais utilizados estão: oxaliplatina (L-OHP), 5-fluorouracil (5-FU), vincristina (VCR), doxorubicina (DOX), cisplatina (CDDP) e irinotecano (CPT-11) (MA *et al.*, 2023; MARIADASON; ARANGO; AUGENLICHT, 2004).

Apesar dos avanços e estratégias utilizadas, a resistência à quimioterapia ainda é um fator comum e desafiador em pacientes com CRC, o que leva a perda da eficácia do tratamento e, conseqüentemente, reincidência em um formato mais agressivo e letal, com taxa de sobrevivência média de 5 anos para apenas 10% dos pacientes (BRENNER; KLOOR; POX, 2014; HU *et al.*, 2016b; LIU; LIU; XIN, 2017; MA *et al.*, 2023; TORRES *et al.*, 2016; ZHENG; ZHOU; TONG, 2015).

Um dos quimioterápicos mais utilizados em CRC avançado ou metastático é a L-OHP (trans-1-diaminociclohexano oxalatoplatino) (Figura 2), um agente platinado de terceira geração, que representou uma melhora terapêutica em relação aos agentes platinados de primeira e segunda geração, a cisplatina e a carboplatina, respectivamente (VAN DER JEUGHT *et al.*, 2018).

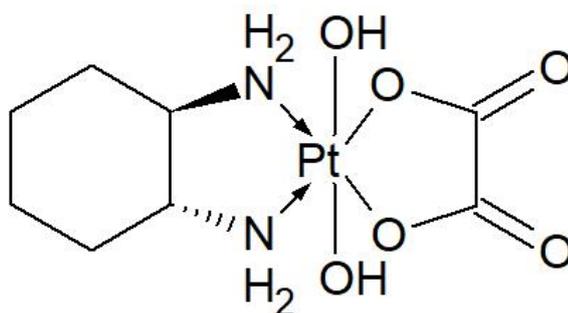


Figura 2 - Estrutura da oxaliplatina.

A L-OHP é da classe dos agentes alquilantes e possui um grupo abandonador oxalato e um ligante carreador DACH (diaminociclohexano), o que permite a formação de ligações covalentes com os nucleotídeos do DNA (adutos de DNA), inibindo a síntese e replicação do DNA, resultado em uma cascata de falhas em processos celulares importantes e, conseqüentemente, morte celular por apoptose e necrose (ALIAN; AZMI; MOHAMMAD, 2012; HOWELLS *et al.*, 2011; PEREGO; ROBERT, 2016).

A eficiência da L-OHP em relação aos outros compostos platinados está na capacidade desta: (I) formar um volume maior de ligações no DNA; (II) levar a formação de adutos mais hidrofóbicos; (III) formação de adutos com um ângulo de ligação N-Pt-N mais restrito, onde primeiro forma-se um mono-aduto transitório para só depois formar um di-aduto estável, principalmente com os resíduos de guanina; e (IV) um número de adutos intra-filamentos mais

abundantes do que os outros compostos platinados; o que leva a formação de adutos mais difíceis de serem reconhecidos pelo sistema de reparo do DNA e sem resistência cruzada com cisplatina e carboplatina (NEVES; VARGAS, 2011; SEETHARAM; SOOD; GOEL, 2009).

A introdução da L-OHP como primeira ou segunda linha terapêutica para tumores avançados ou metastáticos permitiu um aumento significativo na expectativa de vida dos pacientes, o que é melhorado quando é feita a administração de quimioterápicos combinados, como na utilização com os fármacos 5-FU e leucovorina, mas que, ainda assim, apresenta uma taxa de resistência para 40% dos pacientes tratados (ALIAN; AZMI; MOHAMMAD, 2012; BRAUN; SEYMOUR, 2011; HOWELLS *et al.*, 2011; MARTINI *et al.*, 2020; YU; CHEUNG, 2018).

Como os tratamentos, em sua maioria, são realizados em regimes de longo prazo, algumas células acabam sofrendo alterações moleculares ao longo do tempo e adquirindo mutações favoráveis ao perfil de resistência à quimioterapia, as quais podem ser causadas por fatores intrínsecos ou adquiridos (CEBALLOS *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2022; MARTINI *et al.*, 2017; SCANU; DE MIGLIO, 2023). Para além das alterações moleculares, é importante mencionar o papel do próprio microambiente tumoral na promoção da resistência à L-OHP por meio do acúmulo prolongado da platina nos fibroblastos associados ao câncer (CAF – do inglês: *cancer associated fibroblasts*), o que estaria levando ao aumento expressivo da atividade de TGF- β , resultando em uma cascata de fatores que promovem a progressão do CRC e a resistência ao tratamento (LINARES *et al.*, 2023).

No que se refere aos fatores moleculares, a aquisição do perfil de resistência à fármacos pelas células tumorais é conhecida como perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR – do inglês: *multidrug resistance*), o qual se caracteriza pelo desenvolvimento de diversos mecanismos que acontecerão em conjunto ou não e, por sua vez, levam a célula tumoral a escapar do efeito apoptótico de fármacos anticâncer e, conseqüentemente, falha no tratamento e aumento da malignidade (CEBALLOS *et al.*, 2018; GOTTESMAN, 2002).

Diversos fatores podem estar envolvidos na aquisição do perfil MDR, como: (1) alteração das vias de apoptose, com o aumento de proteínas envolvidas no reparo do DNA; (2) maior metabolização com inativação do fármaco; (3) aumento da expressão de bombas de efluxo na membrana, muitas vezes ocorrendo ao mesmo tempo que a diminuição do influxo do fármaco; (4) alteração dos checkpoints do ciclo celular; entre outros (CEBALLOS *et al.*, 2019; EL KHOURY *et al.*, 2016; GILLET; GOTTESMAN, 2012; LIU *et al.*, 2010; RUIZ DE PORRAS *et al.*, 2016).

Dentre os citados acima, um dos principais fatores envolvidos na aquisição de resistência à L-OHP é o aumento das proteínas de reparo do DNA ou maior tolerância ao acúmulo de adutos no DNA (HOWELLS *et al.*, 2011), sendo o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês: *nucleotide excision repair*) o principal mecanismo de reparo de DNA responsável por exercer a proteção da célula tumoral, o qual envolve um complexo de proteínas que realizam o reconhecimento do aduto platina-DNA, demarcação da região, formação do complexo de excisão, seguido da excisão e substituição do fragmento de DNA alterado e, conseqüentemente, evasão da apoptose (ESCALANTE; QUIÑONES; CONTRERAS, 2021; MARTIN; HAMILTON; SCHILDER, 2008).

A principal proteína envolvida nesse processo é a ERCC1 (do inglês: *excision repair cross-complementation group 1*), a qual juntamente com a expressão das proteínas da classe XP (do inglês: *xeroderma pigmentosum complementation, group A-G*) irá formar um heterodímero/complexo responsável pela excisão dos adutos de DNA causados pela L-OHP, proteínas essas que estão frequentemente elevadas em células que desenvolveram resistência (ARNOULD *et al.*, 2003; KAP; POPANDA; CHANG-CLAUDE, 2016; MARTIN; HAMILTON; SCHILDER, 2008; SEETHARAM; SOOD; GOEL, 2009).

Um outro mecanismo comum às células tumorais quimio-resistentes é a superexpressão das bombas de efluxo, responsáveis por retirar o quimioterápico de dentro da célula, o que associado a redução da captação do fármaco (influxo) resulta em uma queda significativa da eficácia terapêutica (CEBALLOS *et al.*, 2019; EL KHOURY *et al.*, 2016; HOFFMANN; LAMBE, 2014; RUIZ DE PORRAS *et al.*, 2016).

As proteínas responsáveis pelo aumento do efluxo são conhecidas como transportadores de cassetes de ligação de ATP ou transportadores ABC, as quais são ATP dependentes e, no geral, tem uma correlação negativa entre a sua expressão e o prognóstico (CEBALLOS *et al.*, 2019; GILLET; GOTTESMAN, 2012; GOTTESMAN, 2002; GUPTA *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2019). As principais proteínas envolvidas nesse processo são: (1) P-gp: conhecida como glicoproteína-P, codificada pelo gene MDR1/ABCB1; (2) MRP: conhecida como proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas, a qual é codificada pelo gene ABCC1; e (3) BCRP: do inglês *breast cancer resistance protein*, codificada pelo gene ABCG2.

Algumas das características associada ao perfil MDR são comumente encontradas em células-tronco tumorais (CSC, do inglês: *cancer stem cells*), como: quiescência celular, superexpressão de transportadores ABC, metabolismo de drogas alterado, alta resposta a danos no DNA, superativação de vias pró-sobrevivência (exemplo: perda de expressão de BAX), entre

outros, o que torna a presença dessa população um fator mais agravante para o sucesso da terapia (AL BITAR *et al.*, 2023; RAMASAMY *et al.*, 2015).

Não necessariamente todas as células da massa tumoral irão apresentar todos os mecanismos de resistência, mas, sim, existirão diversas subpopulações de células utilizando diferentes mecanismos, o que é conhecido como heterogeneidade molecular, e explica o porquê de pacientes em um mesmo estágio do câncer responderem de forma diferenciada ao tratamento, bem como a mudança da resposta ao longo do tempo (BINEFA *et al.*, 2014b; CONDE *et al.*, 2016; DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

De acordo com MENTER *et al.* (2019), os casos de CRC avaliados para determinação dos subtipos moleculares levou a constatação de que 13% dos tumores analisados teriam características moleculares mistas de diferentes CMS, o que foi sugerido como um fenótipo de transição ou um representativo da heterogeneidade intratumoral.

Dessa forma, uma doença heterogênea exige uma abordagem igualmente diversa, que pode explorar modalidades diferentes ou mesmo diferentes agentes químicos de uma mesma modalidade, como o uso de quimioterápicos combinados, de forma a induzir a morte celular por diferentes vias e evitar a reincidência do tumor (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018; HU *et al.*, 2016a).

A ideia central é utilizar terapias que atuem por vias distintas, de forma a evitar todos os possíveis mecanismos de escape do tumor e ao mesmo tempo gerar uma menor toxicidade sistêmica, visto que há a possibilidade de se encontrar um equilíbrio entre as doses de cada fármaco, de forma a diminuir os efeitos adversos de quando estes são usados isoladamente e, conseqüentemente, em doses mais elevadas (ANITHA *et al.*, 2016; HODGKINSON; KRUGER; ABRAHAMSE, 2017; LIU *et al.*, 2018; SPRING *et al.*, 2015).

Na intenção de contrapor os mecanismos de resistência celular, tem-se tentado desenvolver e explorar alternativas terapêuticas que possam vir a contribuir com uma resposta melhorada contra tumores resistentes (MARTINS-GOMES; SILVA, 2023; RAMASAMY *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que essas estratégias vêm para somar às abordagens padrão, complementando sua importância já conhecida clinicamente.

Uma dessas estratégias é a associação de fármacos com a curcumina (Figura 3), isolada do açafrão-da-terra (*Curcuma longa*), a qual tem recebido atenção devido a sua propriedade quimiosensibilizante, sendo relacionada como um promissor adjuvante à quimioterapia em modelos de CRC resistentes e com ensaios clínicos já em andamento (ANITHA *et al.*, 2016; BAHRAMI; MAJEED; SAHEBKAR, 2019; CEBALLOS *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2005, 2023;

GOU *et al.*, 2011; HOWELLS *et al.*, 2011; HOWELLS; MITRA; MANSON, 2007; RUIZ DE PORRAS *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2017).

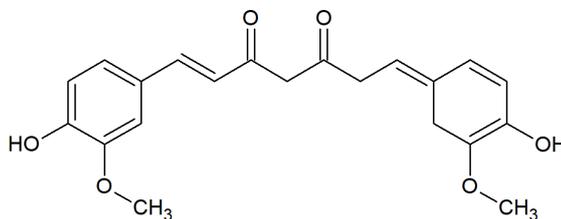


Figura 3 - Estrutura química da curcumina.

Além da atividade antitumoral, o crescente interesse na curcumina está relacionado a sua ausência de toxicidade e por ela atuar como um cito-protetor aos danos causados por quimioterápicos nas células saudáveis, efeito contrário do observado em células neoplásicas (LARASATI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018).

Dentre os mecanismos que contribuem para o efeito adjuvante da curcumina, tem-se: (1) aumento da expressão de p53, levando à parada do ciclo celular (HOWELLS; MITRA; MANSON, 2007; WANG *et al.*, 2016); (2) inibição das vias mediadas pelo fator nuclear κ B (NF- κ B), vias conhecidas por contribuírem na resistência e no processo de invasão e metástase (BAHRAMI; MAJEED; SAHEBKAR, 2019; RUIZ DE PORRAS *et al.*, 2016); (3) inibição da função e expressão de P-gp (CEBALLOS *et al.*, 2019; LOPES-RODRIGUES; SOUSA; VASCONCELOS, 2016; NEERATI; SUDHAKAR; KANWAR, 2014); (4) aumento da expressão da proteína pró apoptótica BAX (RAMASAMY *et al.*, 2015; SHAKIBAEI *et al.*, 2013); entre outros.

Como exemplo, temos o trabalho de HOWELLS; MITRA; MANSON (2007), que analisaram a capacidade antitumoral de curcumina combinada com L-OHP sobre diferentes linhagens celulares de CRC, onde os autores viram que a combinação levou à uma maior eficácia por meio da indução de parada do ciclo celular, confirmado pelo aumento significativo da expressão da proteína p53. Demonstrando o efeito adjuvante à quimioterapia exercido pela curcumina.

Um outro trabalho que explorou a ideia de utilizar a curcumina como um adjuvante à L-OHP foi o estudo de RUIZ DE PORRAS *et al.* (2016), onde os autores utilizaram diferentes linhagens de CRC resistente a L-OHP e trataram com combinações de curcumina com o quimioterápico. Eles conseguiram demonstrar que a curcumina age como um inibidor do NF- κ B, comumente exacerbado em células tratadas a longo prazo com fármacos antineoplásicos e

relacionado ao desenvolvimento do perfil de resistência. Nesse sentido, a ação inibidora da curcumina sobre NF- κ B leva a uma cascata de reações que culminam na supressão da proliferação e apoptose das células resistentes. Ao final, os autores sugeriram que esse sinergismo gera a perspectiva de reduzir as doses de L-OHP na clínica para diminuir os efeitos adversos e, ainda assim, ter um tratamento eficaz.

Um outro efeito da curcumina que a torna um fármaco promissor é a sua capacidade de inibição dos transportadores ABC, o que tem sido relacionado a um aumento nos níveis citoplasmáticos de quimioterápicos e, conseqüentemente, uma maior eficácia antitumoral (CEBALLOS *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018; NORATTO *et al.*, 2013). Em 2013, NORATTO *et al.* demonstraram em seu estudo a capacidade supressora que os curcuminóides têm sobre a expressão da bomba de efluxo P-gp, o que levou ao aumento do efeito antitumoral do quimioterápico 5-FU *in vitro*.

Semelhante ao observado por outros autores, FAN *et al.* (2017) estudaram o efeito da curcumina em uma linhagem de CRC resistente ao quimioterápico 5-FU (HCT-8/5-FU). Nesse estudo, os autores viram que a curcumina tem o potencial de prevenir a progressão tumoral e reverter o perfil MDR por meio da supressão da expressão de P-gp, BCL-2, survivina, e HSP-27. Corroborando com o observado por FAN e colaboradores, HE *et al.* (2019) também demonstraram que a curcumina pode inibir a proliferação de células de CRC, exibindo capacidade de reverter a resistência a 5-FU na linhagem HCT-8/5-FU por meio da promoção de apoptose e regulação negativa de P-gp e da HSP-27.

Semelhante a ideia de SPRING *et al.* (2015), já mencionada anteriormente, LIU *et al.* (2018) ressaltaram em seu estudo que o uso combinado da curcumina pode levar ao ajuste da dosagem dos quimioterápicos que seriam expelidos pelas bombas de efluxo, como é o caso da L-OHP, visto que a curcumina teria a capacidade de aumentar a absorção e reduzir a depuração do fármaco, levando a maior eficácia. Porém, combinar outras terapias ainda pode ser necessário para potencializar o efeito inibitório em casos de paciente com resistência à quimioterapia.

Outra modalidade promissora e que vem ganhando espaço é a terapia fotodinâmica (TFD), a qual apresenta efeitos terapêuticos contra diversos tipos de tumores, seja como um agente sensibilizador para uso de outros fármacos ou sobre células já sensibilizadas (BITEGHE; DAVIDS, 2017; LIN *et al.*, 2016; LUO; ZHANG; LU, 2017).

A ação da TFD, representada na Figura 4, é por meio de interações entre um agente fotossensibilizante (FS) e uma fonte de luz em um comprimento de onda específico, levando a

produção de energia livre que reage com o oxigênio molecular por meio da transferência de energia, culminando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez podem induzir estresse e morte por apoptose ou necrose, danos aos vasos sanguíneos associados ao tumor e promoção da resposta imunológica (KAWCZYK-KRUPKA *et al.*, 2016; MUEHLMANN *et al.*, 2015; SPRING *et al.*, 2015).

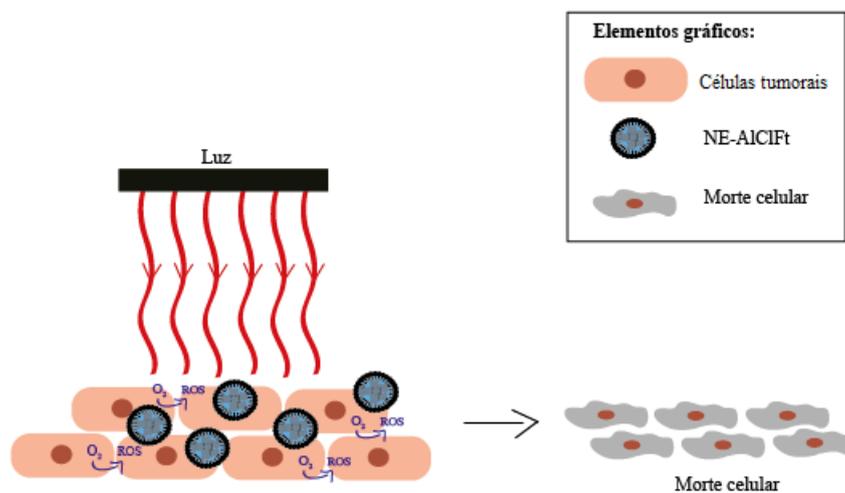


Figura 4 - Ação da terapia fotodinâmica sobre células tumorais. Onde, NE-AIClFt: nanoemulsão contendo o fotosensibilizante alumínio cloro ftalocianina; ROS: espécies reativas do oxigênio; O₂: oxigênio. Figura autoral.

Trabalho desenvolvido por SHE *et al.* (2021) avaliou o potencial da terapia combinada de TRAIL+TFD no tratamento *in vivo* de CRC resistente ao tratamento com TRAIL. O trabalho foi baseado no fato de que tem sido observada uma resistência cruzada ao tratamento com o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL, do inglês: *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) em muitas células de CRC, implicando na necessidade de combinar TRAIL com outras terapias sensibilizantes. Eles utilizaram o FS Ze-IR700. Como resultado, os autores observaram um efeito antitumoral sinérgico prolongado após o tratamento TRAIL+TFD em camundongos por meio da regulação positiva dos receptores de morte celular, induzindo apoptose.

Em seu estudo, LIN *et al.* (2016) utilizaram duas linhagens celulares de CRC resistentes à L-OHP e analisaram o efeito sinérgico de um pré-tratamento com TFD seguido da exposição à L-OHP. Os resultados mostraram que a TFD auxiliou no aumento da atividade antitumoral de L-OHP por meio da diminuição do efluxo do fármaco, relacionado à menor expressão das bombas de efluxo do tipo MRP2, e aumento do acúmulo de quimioterápico, o que foi tido como uma resposta mediada pela produção de ROS e redução da expressão da enzima ERCC1.

Os estudos clínicos com TFD em CRC têm demonstrado um efeito promissor, como exposto na primeira revisão sistemática da literatura clínica sobre o uso de TFD para o tratamento do CRC elaborada por GUIDOLIN *et al.* (2022). Os autores exploraram 19 estudos voltados para essa temática, onde foi levantado que 137 pacientes já receberam tratamento com TFD, em sua maioria de forma paliativa, sendo os FS mais comuns derivados de hematoporfirina ou photofrin, com dose de luz variando de 32 J/cm² a 500 J/cm². Em resumo, a resposta tumoral total (cura) foi relatada para 40% dos casos, já a resposta parcial foi relatada em 43,2%. Os relatores de melhora sintomática foram observados para 51,9% dos pacientes, havendo também relatos de 32 complicações descritas como fotossensibilidade cutânea. Apesar disso, os autores reforçam a importância da promoção de novos estudos que visem fortalecer o conhecimento sobre aplicabilidade da TFD no tratamento do CRC.

Apesar dos efeitos promissores de fármacos como a curcumina e alguns agentes FS utilizados na TFD, eles possuem uma baixa biodisponibilidade por serem bastante hidrofóbicos e, por isso, têm a tendência a se agregarem em meios aquosos, levando a uma necessidade de se utilizar sistemas nanoestruturados para aumentar a eficácia do tratamento (GERA *et al.*, 2017; GOGOI; KAUR; SINGH, 2022; SIMELANE; ABRAHAMSE, 2021; VILSINSKI *et al.*, 2015).

A nanotecnologia é um dos mais novos campos de pesquisa e desenvolvimento, suas aplicações em medicina têm aumentado nas últimas décadas, dando uma nova face, inclusive nos tratamentos oncológicos (HE *et al.*, 2023; JOANITTI *et al.*, 2017). O uso de nanoestruturas permite uma entrega mais precisa da terapia às células tumorais por meio da melhora da biodisponibilidade, entrada do tratamento na célula por endocitose, maior taxa de acúmulo na região tumoral, o que tem permitido respostas mais efetivas e com menos efeitos adversos, quando comparado ao fármaco livre (GANASSIN *et al.*, 2018; GOGOI; KAUR; SINGH, 2022; HODGKINSON; KRUGER; ABRAHAMSE, 2017; MA *et al.*, 2023; SPRING *et al.*, 2015).

A revisão de literatura elaborada por GOGOI; KAUR; SINGH (2022) trouxe um resumo das abordagens baseadas na utilização de nanotecnologia para detecção e tratamento do CRC. Os autores exploraram os diferentes tipos de nanoestruturas (nanoemulsão, lipossomas, nanotubos de carbono, nanopartículas de sílica, nanopartículas de ouro, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, entre outras), bem como resumiram os diversos estudos que reportaram sucesso terapêutico contra o CRC *in vitro* e *in vivo*, incentivando o desenvolvimento de novos trabalhos que explorem essa estratégia e possibilitem a sua implementação clínica.

MA *et al.* (2023) elaboraram uma revisão de literatura sobre novas estratégias para reverter a resistência à quimioterapia em CRC, onde foi abordada a utilização de nanoestruturas.

Os autores trouxeram a ideia de que os sistemas convencionais de entrega de fármacos têm diversas fragilidades que podem contribuir para a resistência farmacológica, como a baixa biodisponibilidade e citotoxicidade. Nesse sentido, eles apresentaram alguns pontos positivos sobre a utilização de nanoestruturas (como lipossomas, hidrogéis, nanocarreadores e exossomos) com o objetivo de superar as desvantagens da aplicação dos sistemas tradicionais no tratamento do CRC.

Pensando nisso, MUEHLMANN *et al.* (2015) desenvolveram uma nanoemulsão (NE) espontânea carreando o FS alumínio cloro ftalocianina (AlClFt) (Figura 5). A NE é uma emulsão coloidal formada por gotículas de óleo dispersas em água, estabilizadas em surfactante, o que possibilita o carregamento de agentes hidrofóbicos como o FS AlClFt e, conseqüentemente, resulta na melhora da biodisponibilidade do FS em meio aquoso. Em seu trabalho os autores obtiveram uma dispersão coloidal monomodal com tamanho aproximado de 25nm, e demonstrada por meio dos ensaios *in vitro* que nanoestruturar esse FS resulta em uma TFD significativamente eficaz no tratamento de células cancerosas, enquanto o FS livre não foi capaz de induzir atividade antitumoral significativa.

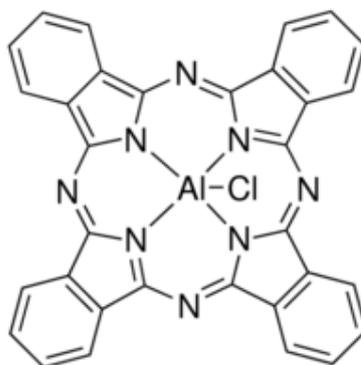


Figura 5 - Alumínio cloro ftalocianina.

Embora diversos estudos venham surgindo visando uma melhor abordagem terapêutica contra o CRC, a aquisição de um perfil resistência à quimioterapia continua sendo um grande desafio clínico e uma das principais causas que levam ao óbito, pois contribui para o surgimento de metástase e também um maior sofrimento do paciente devido aos efeitos colaterais do tratamento (CONDE *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2016; HODGKINSON; KRUGER; ABRAHAMSE, 2017; LIU *et al.*, 2017; MARTINEZ-BALIBREA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017).

Portanto, compreender os mecanismos moleculares que podem levar a falha na resposta terapêutica é uma estratégia fundamental para prever um futuro centrado em abordagens

terapêuticas inteligentes e direcionadas a cada perfil tumoral, tendo como premissa a redução da mortalidade associada ao CRC (CIARDIELLO *et al.*, 2022; LU; JIA; YANG, 2023).

Foi nesse sentido que a revisão de MENTER *et al.* (2019) discutiu o consenso de subtipos moleculares, trazendo à luz algumas questões importantes, como a robustez da classificação CMS no contexto do CRC por meio da descrição clara e estratificada das características biológicas e clínicas, o que possibilita intervenções moleculares direcionadas. Apesar disso, os autores trazem que ainda há uma grande necessidade de estudos multidisciplinares que busquem contrapor os desafios entre a correlação dos subtipos com a prática de rotina clínica, de forma a ofertar o melhor cenário terapêutico para cada paciente.

Sendo assim, ainda há uma necessidade de inovação, bem como um maior entendimento da resposta biológica e molecular por trás do esquema terapêutico empregado, visando possibilitar um melhor direcionamento da terapia para obtenção de uma resposta melhorada, principalmente no caso de pacientes em estágios mais agressivos, onde as perspectivas e a sobrevida permanecem baixas (CIARDIELLO *et al.*, 2022; MODEST; PANT; SARTORE-BIANCHI, 2019; YIN *et al.*, 2019; ZHENG; ZHOU; TONG, 2015).

À vista disso, esse estudo propõe a investigação de uma abordagem multimodal aliada a nanotecnologia em modelo *in vitro* de CRC L-OHP-resistente, tendo como base que o uso combinado de L-OHP, curcumina e TFD pode levar a melhora da resposta ao quimioterápico por meio da ativação ou desativação de vias relacionadas à resistência.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito combinado do uso de curcumina livre ou nanopartículas lipídicas sólidas com curcumina (NLSC) e TFD mediada pela nanoemulsão alumínio-cloro ftalocianina (NE-AICIFt) para melhorar a resposta da L-OHP no tratamento de uma linhagem de câncer colorretal quimiorresistente, visando reverter o perfil de resistência e sensibilizar as células à quimioterapia com L-OHP.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estabelecer e caracterizar uma linhagem tumoral resistente ao quimioterápico L-OHP (HCT116-R);
- II. Determinar a metade da concentração inibitória máxima de L-OHP livre, Curcumina livre, NLSC e TFD usando a NE-AICIFt nas linhagens de células sensíveis (HCT116-S) e HCT116-R;
- III. Analisar o efeito sinérgico dos tratamentos, a fim de escolher a melhor combinação para o modelo *in vitro* das células HCT116-S e HCT116-R;
- IV. Avaliar a eficácia terapêutica dos tratamentos por meio da análise da viabilidade celular, capacidade de formar colônias e ensaio de migração nas células HCT116-S e HCT116-R;
- V. Comparar a eficácia dos tratamentos monomodais, bimodais e trimodais no tratamento das linhagens celulares HCT116-S e HCT116-R por meio da análise de perfil de morte celular;
- VI. Identificar e quantificar, por meio técnica de RNA-seq, os genes que estão diferencialmente expressos (DEGs) nas células HCT116-S, HCT116-R e nas células HCT116-R expostas ao tratamento trimodal;
- VII. Avaliar os DEGs mais significativos identificados por RNA-seq nas células HCT116-S, HCT116-R e nas células HCT116-R expostas ao tratamento trimodal para escolha de genes candidatos para validação posterior por RT-qPCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios seguiram o fluxograma experimental representado na Figura 6.

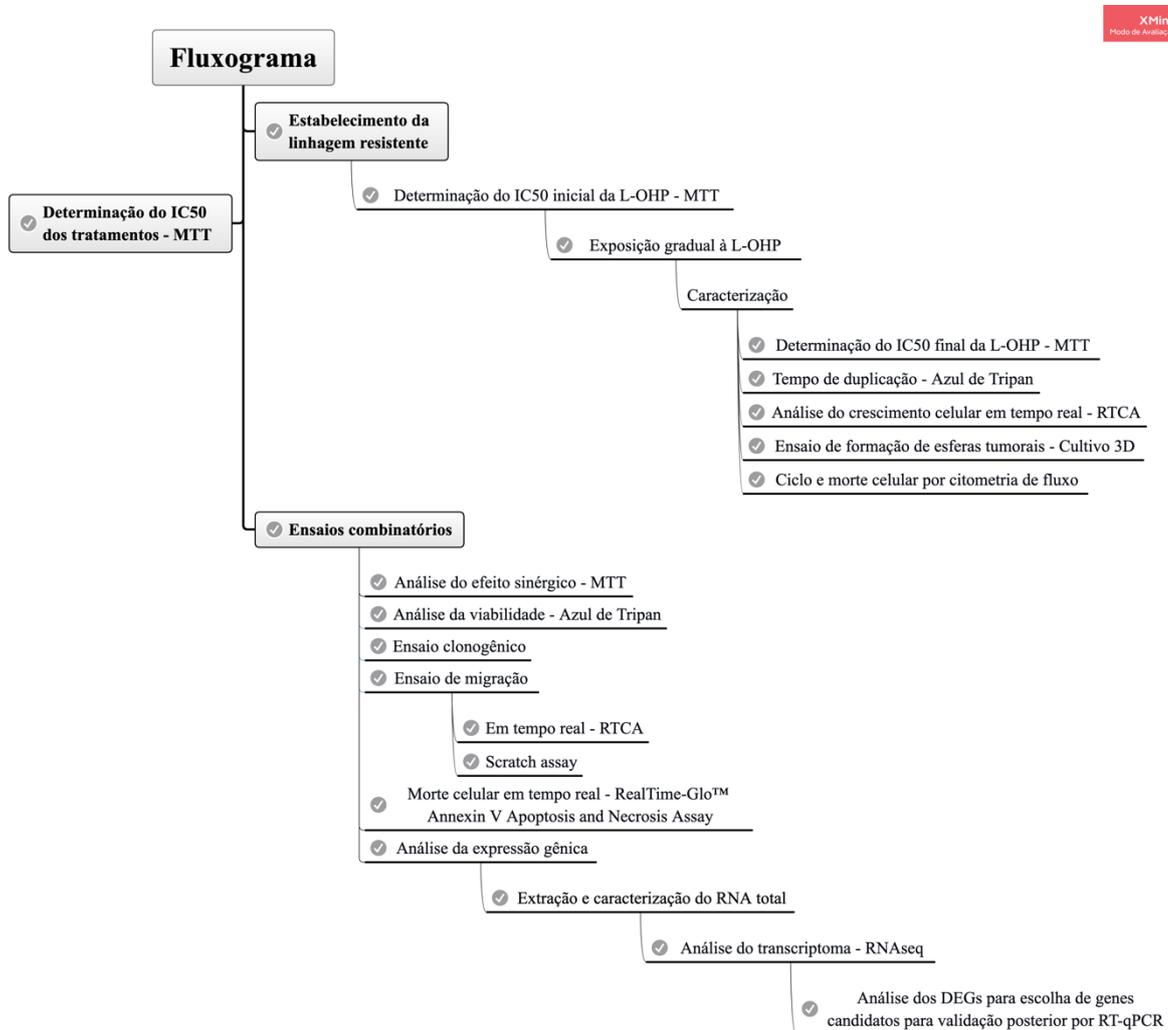


Figura 6 - Fluxograma experimental descrevendo os ensaios realizados.

3.1. CULTIVO CELULAR

A linhagem de células de carcinoma colorretal humano (HCT116), gentilmente cedidas pela Dra. Leticia Veras Costa Lotufo, foi cultivada em meio de cultura RPMI-1640 completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) penicilina/estreptomicina (GIBCO), sendo acondicionadas em incubadora controlada (37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e umidade) e subcultivadas ao atingir 80% de confluência.

3.2. ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM TUMORAL RESISTENTE

Para a indução da linhagem celular resistente a L-OHP (HCT116-R) seguiu-se o protocolo adaptado de (ZHANG *et al.*, 2018). Para isso, primeiro foi determinada a

concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀) para oxaliplatina (L-OHP) (Energy Chemical, China. Cat. No. E0215670050, CAS No. 61825-94-3) por meio do ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) no tempo de 48 horas, o qual visa avaliar a citotoxicidade de um fármaco *in vitro* por meio da quantificação da capacidade redução do MTT ao composto formazan pelas desidrogenases mitocondriais, as quais estão ativas em células viáveis (MOSMANN, 1983).

Após cada período estabelecido, o meio foi retirado e cada grupo recebeu a adição de uma solução de MTT (5 mg/mL, Invitrogen, EUA) diluído em meio de cultivo (1:10). Em seguida, as células foram incubadas em estufa à 37°C por 2 horas. Ao final, a solução com MTT foi retirada e foram adicionados 150 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA) para a solubilização dos cristais de formazan, seguido da análise de absorbância à 595 nm em espectrofotômetro de placa.

Com os valores de absorbância obtidos foi determinado o índice de viabilidade celular para cada combinação de tratamento e linhagem, através da Equação 1:

$$\text{Equação 1: Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Absorbância das células tratadas})}{(\text{Absorbância das células não tratadas})} \times 100$$

O valor de IC₅₀ foi obtido pela curva de dose-sobrevivência.

Após a determinação do IC₅₀, as células foram cultivadas em garrafas T75 e ao atingirem 60% de confluência receberam uma concentração inicial de L-OHP correspondente a 1/3 da metade do IC₅₀ do tempo de 48 horas diluída em meio de cultivo. Decorrido 48 horas de exposição ao fármaco, o meio de cultivo foi trocado pelo meio padrão sem L-OHP. Após as células atingirem 80% de confluência, estas foram subcultivadas e, novamente, tratadas com a mesma concentração inicial de L-OHP. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando três vezes para cada concentração, logo após, a concentração foi dobrada e o procedimento foi repetido para a nova concentração.

A linhagem HCT116-R foi considerada estabelecida após a dose equivalente a 10x o valor de IC₅₀, ao final, as células HCT116-R foram sempre cultivadas em meio contendo 4 µM de L-OHP. Para assegurar a manutenção da resistência, não foi excedido mais do que 10 passagens após o estabelecimento da linhagem, sendo o ensaio de MTT repetido esporadicamente para confirmar a manutenção do perfil de resistência.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM RESISTENTE

3.3.1. TEMPO DE DUPLICAÇÃO

Sabendo que após a indução de resistência há mudanças no tempo de duplicação (EL KHOURY *et al.*, 2016), as células HCT116-S e HCT116-R foram comparadas quanto ao seu

tempo de crescimento. Para isso, 2×10^3 células foram cultivadas em placas de 6 poços em triplicata, mantidas até 120 horas, com troca de meio a cada 48 horas. O número de células viáveis foi determinado com auxílio de uma câmera de Neubauer (método de contagem duplo-cego) e coloração com azul de tripan, sendo feitas contagens a cada 24 horas até atingir 120 horas. Ao final, o tempo de duplicação foi calculado com auxílio do software <<<http://www.doubling-time.com/>>> (ROTH V., 2006).

3.3.2. ANÁLISE DO CRESCIMENTO EM TEMPO REAL

A análise do crescimento em tempo real na presença de diferentes concentrações de L-OHP foi realizada por meio do sistema xCELLigence RTCA DP (Roche, San Diego, CA, USA), utilizando placas de 16 poços contendo microeletrodos de ouro no fundo (E-Plate). Foram utilizados cinco grupos experimentais, sendo (1) controle: célula mais meio; (2) L-OHP 5 μM : células na presença de L-OHP à 5 μM ; (3) L-OHP 50 μM : células na presença de L-OHP à 50 μM ; (4) L-OHP 100 μM : células na presença de L-OHP à 100 μM ; e (5) Branco: somente meio para controle do sinal de impedância.

Brevemente, foi adicionado à cada poço um volume de 50 μL de meio para calibrar o equipamento por 10 minutos, logo após, adicionou-se 100 μL de meio contendo $2,5 \times 10^3$ células para cada grupo. Decorridos 30 minutos da adição das células nos poços, as placas foram colocadas no RTCA e foi feita uma calibração do equipamento por 10 minutos, seguido da aquisição das informações do índice celular (IC) por meio da medição da impedância a cada 30 minutos por 120 horas (5 dias). A leitura foi pausada após 24 horas para troca do meio com ou sem tratamento, conforme cada grupo, e a leitura foi retomada até finalizar as 120 horas.

O IC obtido após a cada 24 horas foi utilizado também para determinar o tempo de duplicação, utilizando o software do ensaio anterior, visando obter uma média do tempo comparando os dois ensaios.

3.3.3. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS NA PRESENÇA DE OXALIPLATINA – CULTIVO 3D

Sabe-se que as células resistentes costumam ser mais eficazes na formação de esferas tumorais do que a linhagem parental ou sensível (EL KHOURY *et al.*, 2016), por isso, foi realizado o cultivo 3D das linhagens HCT116-S e HCT116-R ao longo de 7 dias, seguindo a metodologia descrita por FRIEDRICH *et al.* (2009).

Primeiro foi preparada a solução de agarose *Low Melting* a 1,5 % (wt/vol) (Invitrogen) em água destilada à temperatura de 60 °C. Com a solução de agarose ainda em estado líquido, foi adicionado um volume de 50 μL /poço em duas placas de 96 poços. As placas foram deixadas

no fluxo laminar para esterilização por 30 minutos em UV e, ao final, armazenadas por 30 minutos na incubadora de células.

Após esse tempo, as linhagens foram plaqueadas na densidade de 2000 células por poço diluídas em 200 µL de meio de cultivo padrão. As placas foram armazenadas na incubadora de células por 4 dias, quando foram fotografadas com auxílio de microscópio invertido (Invitrogen™ EVOS™ FL Auto Imaging System) e tiveram o meio de cultivo trocado, conforme os grupos utilizados no ensaio anterior, sendo: (1) controle: célula em meio padrão; (2) L-OHP 5 µM: células na presença de L-OHP à 5 µM; (3) L-OHP 50 µM: células na presença de L-OHP à 50 µM; e (4) L-OHP 100 µM: células na presença de L-OHP à 100 µM. Ao final, totalizando 7 dias, as células foram fotografadas novamente.

As fotos foram analisadas com auxílio do software livre ImageJ para a medição do diâmetro horizontal dos esferoides de cada linhagem e cálculo da área total (contorno das esferas e seu valor em pixels). Para determinar a taxa de crescimento dos esferoides, foi seguida a equação 2:

$$\text{Equação 2: Crescimento do esferoide (\%)} = \frac{(\text{pixels 7 dias} - \text{pixels 4 dias})}{\text{pixels 4 dias}} \times 100$$

3.3.4. MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise do tipo de morte celular após cada tratamento utilizou a dupla coloração com o corante anexina V-FITC e iodeto de propídeo, esta técnica se baseia no fato de que durante o processo apoptótico uma série de mudanças vão ocorrer, como maior permeabilidade ou rompimento da membrana, condensação da cromatina, entre outros fatores, permitindo a identificação dos diferentes tipos de morte celular (células viáveis, apoptóticas precoces, apoptóticas tardias, necróticas) (FINK; COOKSON, 2005).

A anexina-V-FITC irá marcar células de acordo com sua afinidade para a fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que fica exposto na parte externa da membrana plasmática quando a célula está em processo apoptótico. Já o iodeto de propídeo, é um agente intercalante de DNA que marcará células que perderam integridade da membrana, visto que isso facilita a sua penetração na célula, processo característico de células em necrose ou apoptose tardia (GÖSCHL *et al.*, 2017).

Para isso, as células HCT116-S e HCT116-R foram cultivadas em uma densidade de 5×10^4 células em uma placa de 12 poços. Após 24 horas, as células foram expostas à diferentes concentrações de L-OHP (5 µM, 50 µM, e 100 µM). Decorridas 48 horas de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, soltas da garrafa de cultivo e centrifugadas, quando foi utilizado o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Invitrogen™), conforme

recomendação do fabricante. Brevemente, as células foram ressuspensas em tampão de ligação, mantidas em gelo e incubadas por 15 minutos no escuro com 5 μL de annexin-V-FITC, seguido de exposição à 10 μL de iodeto de propídeo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A análise foi por meio de citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, USA), localizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, e os dados analisados no software FlowJo™.

3.3.5. ANÁLISE DO CICLO E FRAGMENTAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para analisar as variações características no DNA para cada fase do ciclo celular (sub-G1, G0/G1, S e G2/M), em triplicata, as células HCT116-S e HCT116-R foram cultivadas em uma densidade de 1×10^5 células em uma placa de 12 poços. Após 24 horas, foram feitos os tratamentos com L-OHP 5 μM , 50 μM , e 100 μM . Logo após decorridas 24 horas de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, soltas da garrafa de cultivo e centrifugadas e o sobrenadante removido para adição de 1 mL de etanol 70% gelado overnight.

Após o período de incubação, o pellet foi lavado com PBS e incubado com uma solução de ribonuclease A (RNase A, 0,05% - Ludwig Biotecnologia LTDA) por 30 minutos, seguido da incubação com iodeto de propídeo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - Invitrogen™) por 30 minutos. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, USA), localizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, e os dados analisados no software FlowJo™ Software.

3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA PARA 50% DAS CÉLULAS TRATADAS COM CURCUMINA LIVRE, NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA CONTENDO CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA

Utilizando o ensaio colorimétrico de MTT descrito no item 1.2, foi determinada a concentração inibitória para 50% das células (IC_{50}) de cada tratamento individualmente para uso nos experimentos seguintes, após a exposição das células HCT116-S e HCT116-R à diferentes concentrações dos fármacos, sendo:

- Curcumina livre (CURC);
- NLSC: nanopartícula lipídica sólida contendo curcumina;
- TFD utilizando a nanoemulsão contendo o agente fotossensibilizante alumínio cloro ftalocianina (NE-AlClFt).

A curcumina livre foi diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA) à uma concentração final de 7.058 μM .

A produção das NLSC e da nanopartícula branca (NLS) seguiu o protocolo descrito por GANASSIN (2020), onde, brevemente, foi adicionado em um béquer um mix de lipídeos (manteira de murumuru 75% e compritol 25%) agitado por 5 minutos à 75 °C, seguido da adição de um mix de tensoativos (Span 20 e Tween 80). A mistura lipídeos e tensoativos foi deixada sob agitação por 10 minutos à 80 °C. Em seguida, foi adicionado 31 mg de curcumina (65%), deixado sob agitação por 20 minutos à 80°C. Ao final, adicionou-se 40 mL de água mili-Q à 70 °C, deixados sob agitação até atingir a temperatura de 91°C, seguido do resfriamento a temperatura ambiente. A formulação branca foi feita da mesma forma, mas sem a adição da curcumina. As propriedades coloidais da NLSC foram: Diâmetro hidrodinâmico (DH): 219 nm \pm 3,2; PDI: 0,2; Potencial zeta (ZP): -3 mV \pm 1,3. Já para a NLS, foi DH: 158 nm \pm 2,9; PDI: 0,1; ZP: -5,2 mV \pm 0,5. A concentração final de curcumina na NLSC foi de 1.357 μ M.

Para a produção da NE-AICIFt foi utilizado o protocolo de nanoemulsificação espontânea estabelecido por MUEHLMANN *et al.* (2015), onde, brevemente, foi misturado 9 g do surfactante Kolliphor[®] ELP, 3 g de óleo de rícino, seguido de 40 mL de etanol e o FS cloreto de alumínio-ftalocianina na concentração final de 100 mM, deixados sob agitação magnética por 1 hora à 100 °C para remoção do etanol. Logo após, foi adicionado 70 mL de água destilada sob agitação até obter uma nanoemulsão transparente e, ao final, foi acrescentado mais 30 mL de PBS para atingir uma concentração final de FS igual a 40 mM. As propriedades coloidais para essa formulação foram: DH: 25 nm \pm 0,5; PDI: 0,1; ZP: -0,3 mV \pm 0,2.

Para a aplicação da TFD foi utilizado um diodo emissor de luz (LED), desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza e colaboradores (Laboratório de Softwares e Instrumentação, Instituto de Física, Universidade de Brasília, DF), sendo o protocolo padrão: (1) exposição das células à NE-AICIFt por 15 min; (2) descarte do meio e lavagem com PBS; (3) adição de meio padrão sem tratamento; (4) exposição ao LED por 10 minutos (fluência de 25,87 J/cm²). Os grupos controles para a TFD: (1) Escuro: células expostas a NE-AICIFt sem estímulo da luz do LED; e (2) LED: células expostas somente a luz do LED, sem exposição prévia à NE-AICIFt.

O grupo controle negativo para a curcumina livre corresponde ao volume de DMSO presente em cada concentração utilizada. Como grupo controle negativo da NLSC, foi utilizada a NLS. Os grupos controles positivos corresponderam às células expostas somente ao meio de cultivo padrão, sendo a sua absorbância final considerada como a viabilidade de 100%.

As células foram plaqueadas em uma densidade de 1x10⁴ de células por poço em placas de 96 poços contendo o meio de cultivo apropriado, sendo feitas em triplicata para cada

concentração. Após 24 horas, o meio foi retirado para adição de 150 μ L de meio de cultivo contendo diferentes concentrações dos fármacos, seguido da análise após 48 horas de exposição aos tratamentos.

3.5. ENSAIOS COMBINATÓRIOS

3.5.1. ANÁLISE DO EFEITO SINÉRGICO

Visando utilizar a melhor combinação para atingir o efeito sinérgico máximo, foi repetido o ensaio de MTT para o tempo de 48 horas, como descrito previamente no item 2, sendo feitas diluições de cada tratamento baseadas no valor de IC_{50} encontrado no ensaio anterior para fazer diferentes combinações dos tratamentos, sempre diluídos em meio de cultivo padrão.

A TFD foi considerada como um pré-tratamento para sensibilização das células, onde a NE-AICIFt foi utilizada na concentração fixa do valor de IC_{50} encontrado no ensaio anterior, seguindo o protocolo padrão já descrito para TFD. Somente após finalizar a TFD, as células foram expostas aos outros tratamentos. L-OHP, curcumina e NLSC foram diluídas no valor de $0,25 \times (IC_{50})$, $0,5 \times (IC_{50})$, IC_{50} , $2 \times (IC_{50})$ e $4 \times (IC_{50})$. O desenho experimental das placas foi baseado em uma organização em matriz, onde o grupo controle de cada tratamento foi a exposição somente ao meio padrão livre de tratamento.

Os valores de absorbância foram utilizados para determinar a fração de inibição de cada combinação para utilização do software livre Compusyn desenvolvido por CHOU; MARTIN, (2005). Cada combinação é representada pelo valor de índice de combinação (CI), o qual é baseado nos conceitos da lei da ação das massas e no princípio do efeito-médio do método desenvolvido por CHOU; TALALAY (1984)

Sinergismo é quando uma substância aumenta ou potencializa as consequências da outra ($CI < 0,9$), aditividade é quando o efeito resultante é a soma dos efeitos individuais ($CI = 0,9 - 1,1$), já o antagonismo é quando uma substância atenua, reduz ou mesmo neutraliza o efeito de outra ($CI > 1,1$) (CHOU, 2006, 2010; GOWDA *et al.*, 2013).

Conforme os resultados obtidos por meio do ensaio de sinergismo (descritos na sessão de resultados), as células foram tratadas com as diferentes combinações dos tratamentos (monomodal, bimodal e trimodal), utilizando as concentrações de cada composto que obtiveram um melhor efeito terapêutico no ensaio de sinergismo no tempo de 48 horas de exposição, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Combinações terapêuticas escolhidas para utilização com cada linhagem nos ensaios subsequentes obtidas por meio da análise de efeito sinérgico, conforme disposto na sessão de resultados. Fa: Fração afetada ou fração de inibição; CI: índice celular; L-OHP: oxaliplatina; CURC: curcumina; TFD: terapia fotodinâmica mediada pela NE-AIClFt.

| Linhagem | L-OHP (μM) | CURC (μM) | TFD | Fa | CI |
|-----------------|---|--|------------|-----------|-----------|
| HCT116-S | 1,5 | 7 | + | 0,65 | 0,77 |
| HCT116-R | 12,5 | 5 | + | 0,61 | 0,63 |

3.5.2. ENSAIO DE VIABILIDADE

A viabilidade celular após os tratamentos foi analisada pelo método de exclusão por azul de tripan. Esta técnica se baseia na integridade funcional da célula, onde células não viáveis possuem membranas danificadas, o que faz com que o corante penetre rapidamente na célula.

Dessa forma, os grupos foram tratados e analisados após 48 horas. A contagem foi feita em triplicata com auxílio de uma câmera de Neubauer e microscópio óptico (Leica DMi1, Alemanha), onde células coradas de azul foram consideradas não viáveis e células não coradas foram consideradas viáveis. Para isso, foram utilizadas placas de 24 poços com uma densidade de 5×10^4 células/poço.

A contagem de células seguiu o protocolo descrito por STROBER (2001), onde, brevemente: as células foram ressuspensas e centrifugadas por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 1 mL de PBS, em seguida foi feita a mistura (1:1) de uma alíquota da suspensão de células com 0,4% de azul de tripan. Decorridos 3 minutos, foi feita a contagem em câmera de Neubauer.

O número final de células viáveis da alíquota foi obtido multiplicando o valor contado por 2, referente ao fator de diluição utilizado. O cálculo final obedeceu a equação 3:

$$\text{Equação 3: Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Total de células viáveis por mL da alíquota}}{\text{Número total de células por mL da alíquota}} \times 100$$

3.5.3. ENSAIO CLONOGÊNICO

Com base na metodologia adaptada de (FRANKEN *et al.*, 2006), foi avaliada a capacidade das células tumorais de se recuperar e formar colônias após tratadas. Para isso, as células HCT116-S e HCT116-R foram plaqueadas em uma densidade de 300 células em placas de cultura de 6 poços. Após 24 horas, foram feitos os tratamentos por 48 horas e, em seguida, o meio de todos os grupos foi trocado para meio padrão, renovado a cada 3 dias. Após um período de 10-14 dias, foi feita a fixação por 5 minutos com metanol geral, coloração com cristal violeta (0,5%, Sigma) por 30-60 min, seguido de lavagem em água corrente e deixado secar em temperatura ambiente por 2 dias.

As colônias celulares foram visualizadas e contadas com auxílio de um estereomicroscópio. Sendo, uma colônia consistindo em no mínimo 50 células. Foi feita a contagem total de colônias em cada um dos três poços dos diferentes tratamentos. Ao final, foi calculado a eficiência do plaqueamento (EP) e a fração de sobrevivência (FS), equação 4 e 5, respectivamente:

$$\text{Equação 4: } EP = \frac{N^{\circ} \text{ de colônias formadas}}{N^{\circ} \text{ de células plaqueadas}} \times 100$$

$$\text{Equação 5: } FS = \frac{\text{Número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Número de células plaqueadas} \times EP}$$

3.5.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO – SCRATCH ASSAY

Visando analisar a capacidade de migração celular e interação célula-célula após os tratamentos, foi utilizado o ensaio de cicatrização (do inglês: *scratch assay*), no qual é feito um arranhão em uma monocamada de células, seguido do acompanhamento por meio da captura de imagens em diferentes intervalos de tempo para obter a quantificação da taxa de migração (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2005).

Para isso, 5×10^5 células HCT116-S e HCT116-R foram plaqueadas em placas de 12 poços por 24 horas para obtenção de uma monocamada. Em seguida, a monocamada foi rompida (formação do gap) com o auxílio de uma ponteira P200 na parte central de cada poço, logo após, foi feita lavagem com PBS para retirar as células rompidas e realizada a exposição aos tratamentos combinatórios nas concentrações descritas na Tabela 1.

As imagens fotográficas de diferentes pontos de cada grupo foram obtidas nos tempos 0, 24 e 48 horas com auxílio de um microscópio de contraste de fase (Leica DM11, Alemanha). A análise da taxa de migração ou fechamento da ferida foi feita com auxílio do software livre ImageJ, onde a área foi calculada para determinar o percentual de fechamento da ferida.

3.5.5. ENSAIO DE MIGRAÇÃO-EM TEMPO REAL

Visando corroborar as observações do ensaio de migração convencional, mencionado anteriormente, também foi conduzido um ensaio de migração em tempo real por meio do sistema xCELLigence RTCA DP (Roche, San Diego, CA, EUA), utilizando placas CIM-plate 16. Esse sistema permite a medição em tempo real da taxa de migração através dos microeletrodos disponíveis nos poros da membrana que divide a cabine superior e inferior da placa CIM-plate 16, o que possibilita a quantificação do sinal de impedância quando há migração.

Brevemente, devido a dificuldade de realizar a TFD em células em suspensão, as células foram contadas e plaqueadas em uma concentração de 2×10^5 células em placada de 6 poços,

após 24 horas foi feita a exposição aos tratamentos de forma padrão, conforme realizado nos ensaios anteriores.

Decorridas 48 horas de exposição aos tratamentos, o sobrenadante foi guardado e os poços foram lavados com PBS, as células aderidas foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio sem SFB e adicionado com o sobrenadante retirado. Após isso, foi feita a centrifugação e os grupos foram contados com auxílio de azul de tripan.

Por fim, as células vivas e mortas foram plaqueadas em triplicata em uma concentração de 6×10^4 em 100 μ l no poço superior da placa CIM-plate diluídas em meio de cultivo sem SFB. No poço inferior, foi colocado 160 μ l de meio de cultivo contendo SFB, como quimioatrativo para estimular a migração celular. A aquisição do IC foi feita a cada 15 minutos por 48 horas. Os dados de IC foram utilizados para determinar a atividade migratória das células após exposição aos tratamentos.

3.5.6. ENSAIO DE MORTE CELULAR EM TEMPO REAL

Para avaliar o perfil de morte celular das células HCT116-S e HCT116-R após cada combinação terapêutica foi utilizado o kit RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, Madison, WI, EUA).

Baseando-se nas modificações celulares que ocorrem durante o processo apoptótico, mencionado no tópico 3.3.4., as quais permitem a identificação dos diferentes tipos de morte celular (células viáveis, apoptóticas precoces, apoptóticas tardias, necróticas), esse kit permite avaliar o perfil de morte celular em tempo real por meio da medição da exposição da fostadilserina na camada externa da membrana celular através do sinais de luminescência (RLU), quando há ligação da Anexina V (apoptose precoce), e sinais de fluorescência (RFU), quando há ligação do marcador de necrose ao DNA (perda de integridade da membrana) (Figura 7).

Portanto, a combinação desses sinais permite diferenciar os diferentes efeitos citotóxicos dos fármacos ao longo do tempo. Sendo dividido em:

- Sem sinal de RLU e RFU: células viáveis;
- Sinal de RLU e sem indicativo de RFU: apoptose precoce;
- Sinal de RLU e com indicativo de RFU: apoptose tardia;
- Sem sinal de RLU e indicativo de RFU: células necróticas ou apoptose muito tardia.

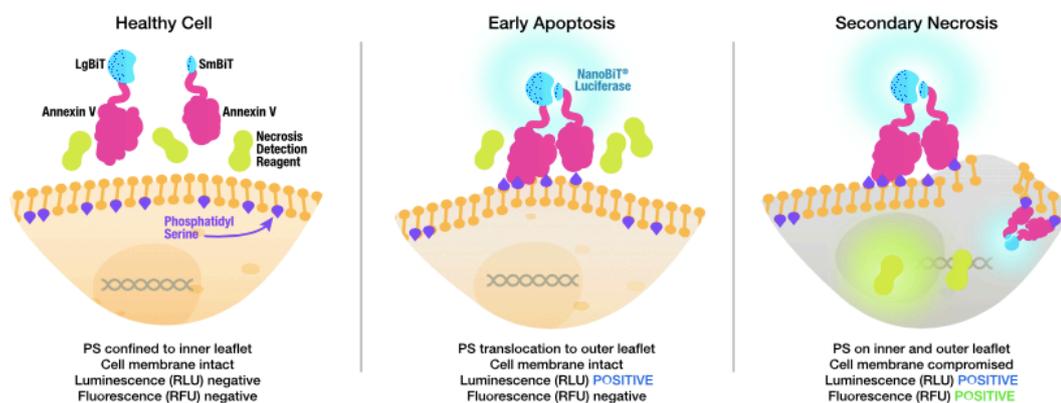


Figura 7 - Mecanismos de ação do kit RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, Madison, WI, EUA). FONTE: Bula do fabricante.

O protocolo seguiu as instruções descritas na bula do fabricante, onde, brevemente, 1×10^4 células foram plaqueadas em placa de 96 poços do tipo branca. Decorridas 24 horas, foram adicionados 100 μ l de meio completo com ou sem tratamento em duplicata, conforme desenho experimental padrão (Tabela 1). Os grupos controle positivo (Controle +) de apoptose corresponderam as células tratadas com seu respectivo valor de IC50. Os grupos controle negativo (Controle -) corresponderam as células expostas somente ao meio de cultivo padrão.

Imediatamente a adição dos tratamentos, foi adicionado a cada poço um volume de 100 μ l do Reagente de Detecção 2X diluído em meio completo, conforme instruções do fabricante, seguido da incubação e leitura no espectrofotômetro Varioskan™ LUX (Thermo Scientific, Singapura) capaz de detectar luminescência e fluorescência (Excitação: 485 nm; Emissão: 525 nm; Largura da banda de excitação: 12 nm; e Fluoróforo: Alexa flúor 488), utilizando o software Skanlt Version 7.0 (Thermo Scientific, Singapura).

Ao final, os dados de RLU e RFU ao longo do tempo foram utilizados para interpretação do padrão de morte células. Para facilitar a interpretação dos dados foi utilizado o cálculo matemático área sob a curva (AUC, do inglês: area under the curve) a partir da cinética de marcação calculado automaticamente por meio do software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EUA), ignorando os picos que eram inferiores a 10% da distância entre os valores Y mínimo e máximo. O método AUC é considerado o mais simples para interpretação desses dados por comprimir os dados cinéticos em um único parâmetro, possibilitando realizar comparações mais eficientes (GELLES *et al.*, 2019).

3.5.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para a extração do RNA total foram selecionados os seguintes grupos: HCT116-S, HCT116-R e HCT116-R trimodal.

3.5.7.1. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RNA TOTAL

Para a extração do RNA total, uma concentração de 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços por 24 horas, seguido da exposição ao tratamento para o grupo trimodal ou apenas troca de meio padrão. Decorridas 48 horas, os poços foram tripsinizados, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e lisadas para extração e purificação do RNA total, em ambiente livre de RNases, conforme instruções do fabricante do kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

As amostras foram quantificadas utilizando o método fluorimétrico específico para RNA por meio do kit Qubit™ RNA High Sensitivity (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante.

A qualidade e pureza do RNA foi avaliada por meio da técnica de eletroforese capilar das amostras, utilizando o kit Agilent RNA 6000 Nano Chips e o sistema Bioanalyzer® Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, EUA) para obtenção do RNA Integrity Number (RIN), sempre seguindo as recomendações descritas pelo fabricante. Os valores de RIN variam em uma escalada de 1 a 10, sendo 1 para RNA degradado e 10 para o RNA mais íntegro. Essa metodologia considera a razão entre as subunidades 28S e 18S do ribossomo.

3.5.7.2. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA POR RNA-SEQ

O sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês: *Next-generation sequencing*) do transcriptoma (RNAseq) permite uma análise ampla da expressão de genes em um contexto específico contra um genoma de referência, possibilitando estudar as regiões do DNA que são transcritas em RNA mensageiro (RNAm) e podem estar ligadas a produção de proteínas importantes na resposta celular observada (HONG *et al.*, 2020; URH; ZIDAR; BOŠTJANČIČ, 2022). Portanto, em resumo, RNAseq permite: avaliar a expressão gênica de uma amostra ou organismo de interesse mediante uma condição/tratamento imposto; avaliar a expressão diferencial de diferentes genes entre amostras específicas; e identificar genes e, conseqüentemente, vias que possam estar desempenhando um papel crucial na resposta terapêutica observada (KIM *et al.*, 2021; SHAHEEN *et al.*, 2018; SOROKIN *et al.*, 2022).

No contexto aqui utilizado, essa técnica teve como objetivo a identificação e quantificação dos genes que possam estar exercendo um papel fundamental na resistência e/ou sensibilidade à L-OHP e implicando no sucesso da terapia aqui empregada para as seguintes

amostras: HCT116-S sem tratamento, HCT116-R sem tratamento e HCT116-R após tratamento com TFD+L-OHP+CURC.

O sequenciamento foi realizado por meio da contratação de prestação de serviço da empresa GenOne Biotech utilizando plataforma Illumina (Illumina, Inc., CA, EUA). Conforme as exigências da empresa, apenas as amostras com RNA total puro (OD 260/280>2.0) e íntegro (com RIN>6,3) foram enviadas para o sequenciamento. Além disso, também foram consideradas apenas aquelas que tiveram mais de 2 mg de RNA, em concentração > 20 ng/ml e volume acima de 20 ml (Qubit). As amostras selecionadas foram enviadas em tubos GenTegra® RNA (GenTegra LLC, CA, EUA), fornecidos pela empresa contratada, para transporte seguro à temperatura ambiente de amostra seca.

Resumidamente, o protocolo da empresa seguiu o seguinte fluxo metodológico: recebimento da amostra de RNA total seca em tubo de transporte GenTegra® -> recuperação e reconstituição do RNA total -> purificação do RNAm a partir do RNA total utilizando beads magnéticas -> fragmentação do RNA -> transcrição reversa (sintetização da primeira fita de cDNA) -> sintetização da segunda fita de cDNA -> fragmentação do DNA -> End repair & A-tailing -> adição de adaptadores -> seleção de tamanho -> amplificação -> sequenciamento (Illumina).

Os dados do sequenciamento de cada amostra foram disponibilizados por meio de link de drive recebido por e-mail e analisados pelo aluno de doutorado Pedro H. A. Barros. e pelo Prof. Dr. Marcelo de M. Brigido, utilizando os recursos computacionais do laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília.

Resumidamente, para análise dos dados foi feito o pré-processamento dos arquivos de sequenciamento usando o programa fastp (v0.23.0), seguido pelo alinhamento das Reads contra o genoma de referência GRCh38 (hg20) utilizando o programa de alinhamento STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference - v2.7). Após geração do arquivo de alinhamento pelo software STAR e a anotação do genoma fornecida pelo banco de dados GENCODE, foi utilizado o programa htseq-count (v2.0.2) para contar o número de reads que alinharam a cada região do genoma, obtendo a matriz de contagem, relacionada a cada gene, para análise da expressão diferencial utilizando o pacote R DESeq2 (v1.38.2), desenvolvido pelo projeto Bioconductor e disponível em <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>.

Os dados estão representados no comparativo de cada amostra contra outra (“R_CTRL x S_CTRL”; “R_Tripla x S_CTRL”; “R_Tripla x R+CTRL”) como log2 do fold change (FC)

(razão da expressão gênica entre duas condições, sendo definido como a razão entre as médias das expressões), p-valor e o FDR (do inglês: *false discovery rate*). Por fim, foi feita a filtragem dos dados de genes diferencialmente expressos (DEGs, do inglês: *differentially expressed genes*) para as amostras utilizadas, sendo selecionados os genes que apresentaram um valor de p significativo ($p\text{-value} < 0,05$), bem como o $\log_2 \text{FC} \leq -1$ (DOWN) e ≥ 1 (UP). A fim de identificar as vias e funções que poderiam estar envolvidas na resposta aqui observada, foi feita a análise de enriquecimento (*Gene Set Enrichment Analysis - GSEA*) dos DEGs por Gene Ontology (GO).

3.5.7.2.1. ANÁLISE DOS DEGs PARA ESCOLHA DE GENES CANDIDATOS PARA VALIDAÇÃO POSTERIOR POR RT-qPCR

Após obtenção da lista de DEGs para cada condição (“R_CTRL x S_CTRL”; “R_Tripla x S_CTRL”; “R_Tripla x R+CTRL”), eles foram avaliados um a um considerando os seguintes parâmetros ou requisitos:

- p-value significativo em ao menos dois dos comparativos;
- $\log_2 \text{FC} \leq -1$ (DOWN) e ≥ 1 (UP) em ao menos dois dos comparativos;
- No caso de genes de um mesmo grupo/família, foi selecionado aquele que se mostrou mais significativos no $\log_2 \text{FC}$ (UP ou DOWN);
- Desconsiderados os genes que não se fizeram presente em uma das três condições analisadas;
- Relevância/função descrita na literatura por meio de busca na plataforma PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando as palavras-chave: “nome do gene + colorectal cancer”, os genes significativos que tinham sua função, ação ou descrição disponível foram escolhidos como os genes candidatos a serem investigados;
- Escolha dos 20 genes mais relevantes para validação posterior por transcrição reversa quantitativa por reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR, do inglês: *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*).

Por fim, foi realizada uma análise de enriquecimento dos 20 genes candidatos selecionados por meio da plataforma livre EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Essa plataforma é utilizada para análise de enriquecimento funcional de conjuntos de genes, possibilitando a busca de vias que possam estar desempenhando um papel crucial na função desses genes (CHEN *et al.*, 2013; KULESHOV *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2021).

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estão apresentados, em sua maioria, como média \pm EPM (Erro Padrão da Média) ou DP (desvio padrão), conforme sinalizado em cada representação gráfica. Todos os dados foram avaliados estatisticamente no programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EUA), onde foi utilizado o Teste t de Student para o comparativo entre dois grupos e a análise de variância (ANOVA) one-way ou two-way quando foi necessária a comparação entre mais de dois grupos, sempre considerando um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM CELULAR RESISTENTE À OXALIPLATINA

O primeiro passo para a indução da resistência à LOHP foi determinar valor de IC₅₀ para L-OHP da linhagem original (HCT116-S), representado na Figura 8, o qual foi igual a 2,8±0,04 μM.

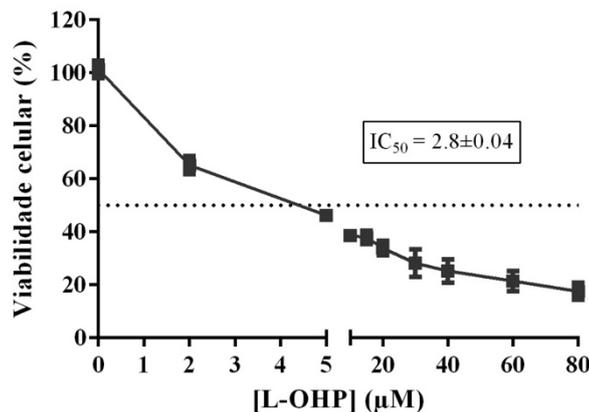


Figura 8 - Análise de viabilidade da linhagem HCT116-S após exposição à L-OHP por 48 horas para determinação do IC₅₀. A linha tracejada representa a viabilidade para 50% das células. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes.

A etapa seguinte foi a exposição gradual à L-OHP até chegar no valor estimado de 10x o IC₅₀ encontrado. O tempo total de exposição para obtenção da linhagem resistente foi de aproximadamente 11 meses. Vale ressaltar que na primeira exposição ao quimioterápico a linhagem estava na passagem 7 (P7) e, após atingir o valor final da resistência, a linhagem HCT116-R estava na P40, sendo utilizada por no máximo mais 10 passagens. Ao longo de todo o período de indução da resistência também foi mantida uma garrafa controle (HCT116-S) exposta somente ao meio de cultivo padrão. Na Figura 9 está representada a fotomicrografia das células HCT116-S e HCT116-R.

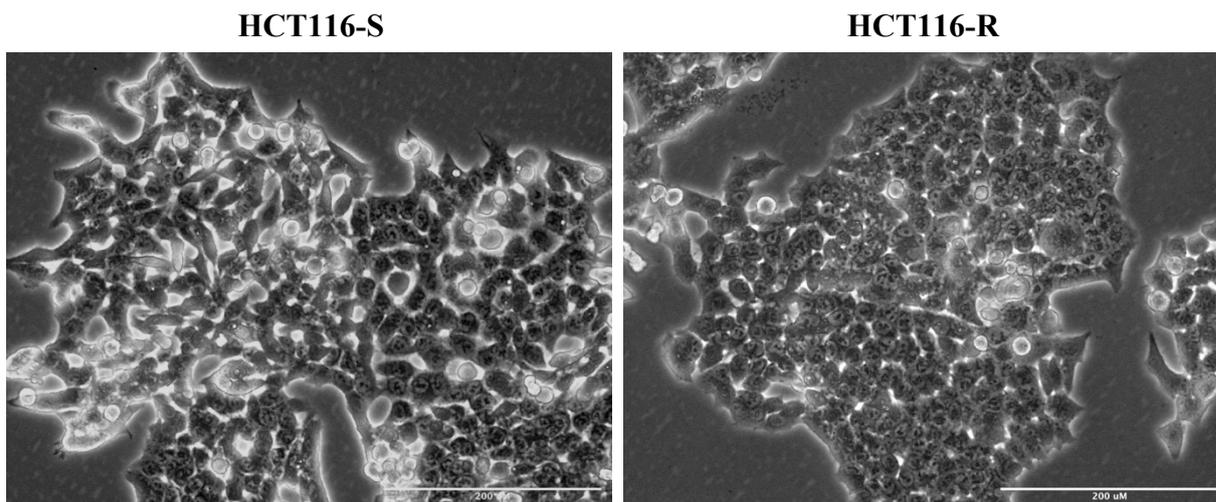


Figura 9 - Fotomicrografia das células HCT116-S (A) e HCT116-R (B). Aumento de 10x. Barra de escala: 200 µm.

O resultado final da resistência foi confirmado por meio do ensaio de viabilidade celular (Figura 10), onde podemos ver uma clara diferença na curva de viabilidade e, conseqüentemente, no valor de IC_{50} para cada linhagem, sendo de $2,7 \pm 0,3$ µM para a linhagem HCT116-S e $26,6 \pm 1,5$ µM para as células HCT116-R, com o índice de resistência igual a $10,2 \pm 1,0$ demonstrando que a linhagem HCT116-R foi significativamente resistente à L-OHP ($P < 0,001$).

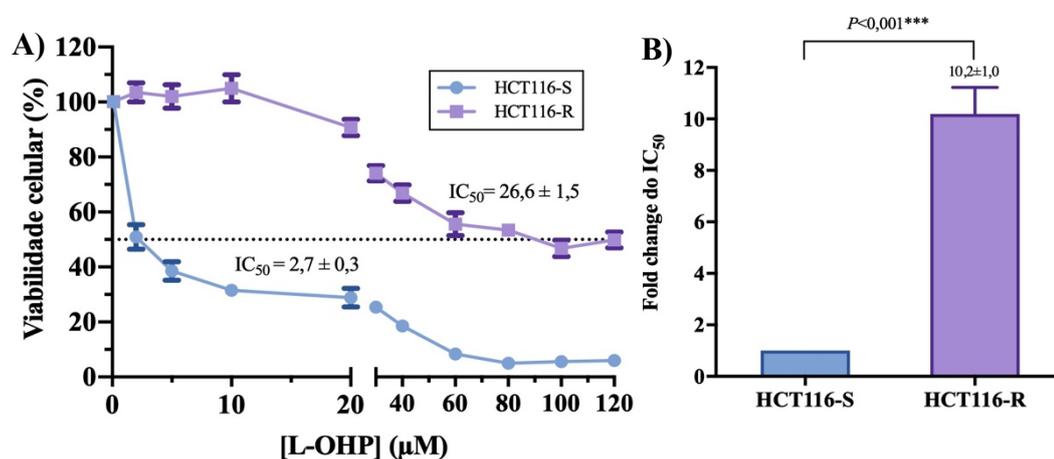


Figura 10 - Análise de viabilidade após o estabelecimento da linhagem resistente por exposição gradual de L-OHP. (A) Exposição à L-OHP por 48 horas para determinação do IC_{50} . A linha tracejada representa a viabilidade para 50% das células. (B) Índice de resistência. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes. Teste t de Student, *** $P < 0,001$.

Visando demonstrar alterações na taxa de crescimento celular entre cada linhagem, foi analisado o tempo de duplicação ao longo de 120 horas, onde podemos observar que as células HCT116-R apresentam um crescimento mais lento do que as células parentais (HCT116-S),

tanto na contagem de células com azul de tripan (Figura 11A), quanto no ensaio em tempo real (Figura 10). O tempo de duplicação da linhagem HCT116-R é de $26,89 \pm 0,8$ horas, significativamente maior ($P > 0,001$) do que o tempo que a linhagem HCT116-S leva para duplicar ($19,29 \pm 0,9$ horas) (Erro! Fonte de referência não encontrada.B).

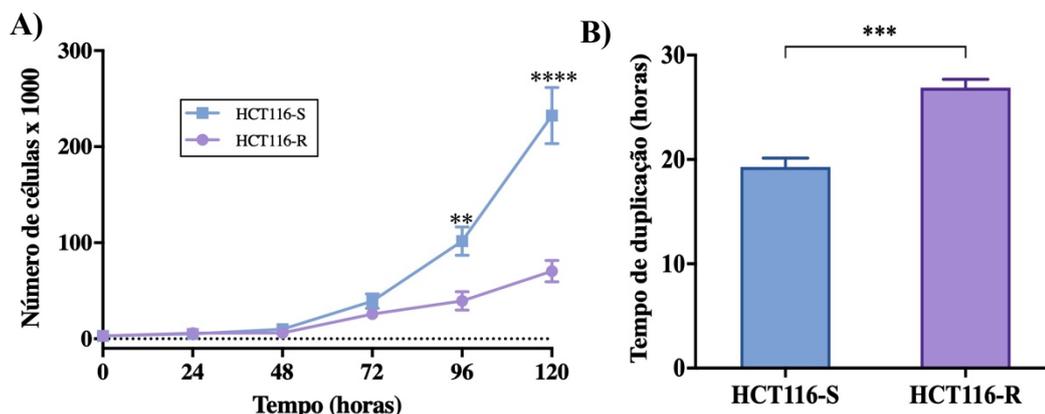


Figura 11 – Análise do crescimento celular. (A) Número de células ao determinado por meio da contagem com azul de tripan ao longo de 120 horas; (B) Tempo médio de duplicação para cada linhagem, utilizando a média de tempo obtido pela contagem com azul de tripan e a análise em tempo real. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes. Teste t de Student: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Corroborando com os dados apresentados no ensaio de viabilidade após indução da resistência, as células HCT116-S não foram capazes de crescer na presença de L-OHP, demonstrado pela queda do valor de índice celular em todas as concentrações, igualando-se ao valor do índice do grupo branco (sem células, somente meio de cultivo) (Figura 12A). Já as células HCT116-R tiveram um crescimento contínuo na presença de L-OHP à $5 \mu\text{M}$, e nas concentrações mais altas (50 e $100 \mu\text{M}$) parecem entrar em um estado de latência ou estacionário (destacado pelo círculo amarelo na Figura 12B), visto que não é detectado aumento e nem queda do índice celular, como foi observado para a linhagem HCT116-S.

Os valores finais, após 120 horas, do percentual do índice celular estão demonstrados na Figura 12C, onde podemos ver que houve diferença estatística no valor do grupo controle das células HCT116-S e os demais grupos. Como já mencionado anteriormente, os grupos controle e $5 \mu\text{M}$ da linhagem HCT116-R tiveram um valor percentual semelhante, diferindo estatisticamente dos demais grupos. A comparação HCT116-S e HCT116-R mostrou os mesmos resultados já mencionados, onde os grupos controles de ambas as linhagens e $5 \mu\text{M}$ da linhagem HCT116-R diferiram significativamente dos outros grupos (5 , 50 e $100 \mu\text{M}$ de HCT116-S; e 50 e $100 \mu\text{M}$ de HCT116-R).

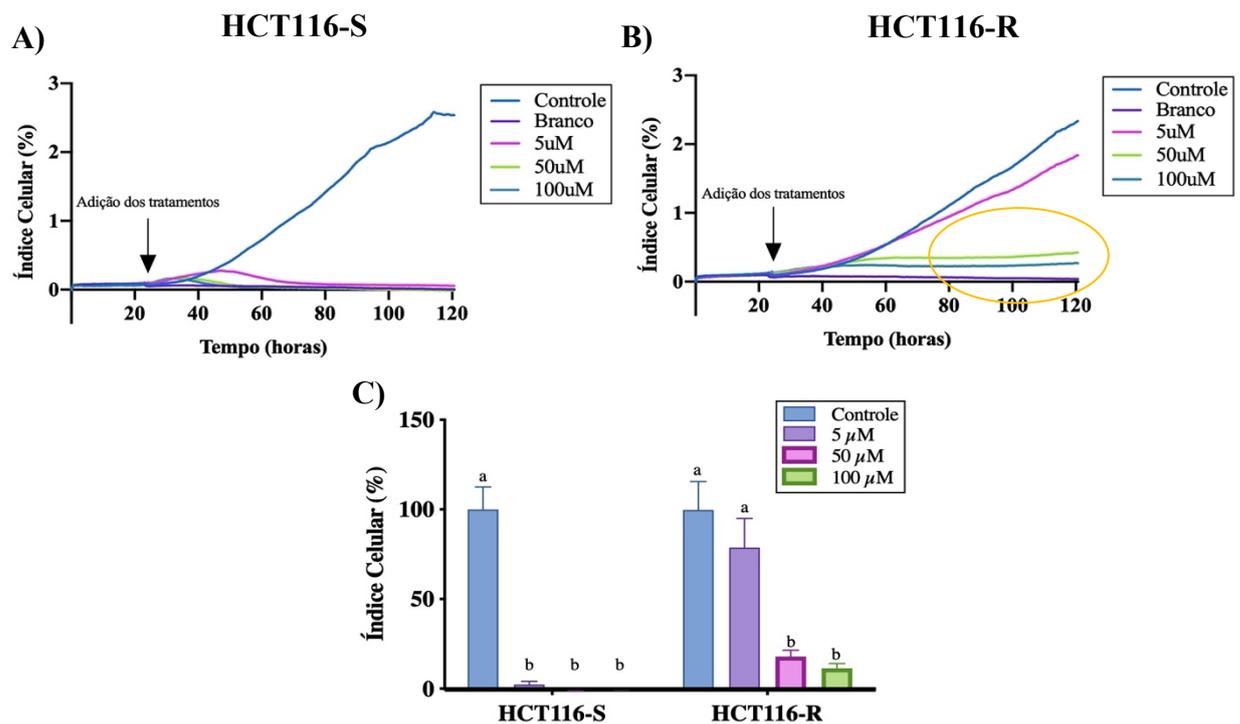


Figura 12 - Análise do crescimento celular em tempo real com exposição contínua a L-OHP. (A) Curva de crescimento da linhagem HCT116-S em tempo real na presença de L-OHP (B) Curva de crescimento da linhagem HCT116-R em tempo real na presença de L-OHP; (C) Percentual do índice celular em relação ao controle ao final de 120 horas na presença ou ausência de oxaliplatina. Índice celular: valor número representando a impedância elétrica medida pelas células em contato com os microeletrodos presentes na microplaca. Círculo amarelo: aparente estado de latência. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes. ANOVA two-way: letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) na comparação entre linhagens e dentro de uma mesma linhagem.

Para validar o observado no ensaio anterior para a linhagem HCT116-R exposta à L-OHP 50 e 100 μ M, o experimento do RTCA foi repetido mais uma vez. Dessa vez, foi realizada uma pausa para retirada tratamento após 48 horas de exposição, quando todos os grupos tiveram o meio renovado com meio de cultivo padrão e a leitura prosseguida até 120 horas, a fim de observar se as células HCT116-R saíam do estado de latência observado. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13.

As células HCT116-S (Figura 13A) exibem a mesma curva observada no ensaio com exposição contínua aos tratamentos. Já para a linhagem HCT116-R, quando comparamos a curva de crescimento do experimento de exposição contínua com a Figura 13B, após a retirada do meio com L-OHP, as células HCT116-R parecem iniciar uma saída do seu estado estacionário nos grupos que receberam 50 e 100 μ M (destacado pelo círculo amarelo na Figura 13B).

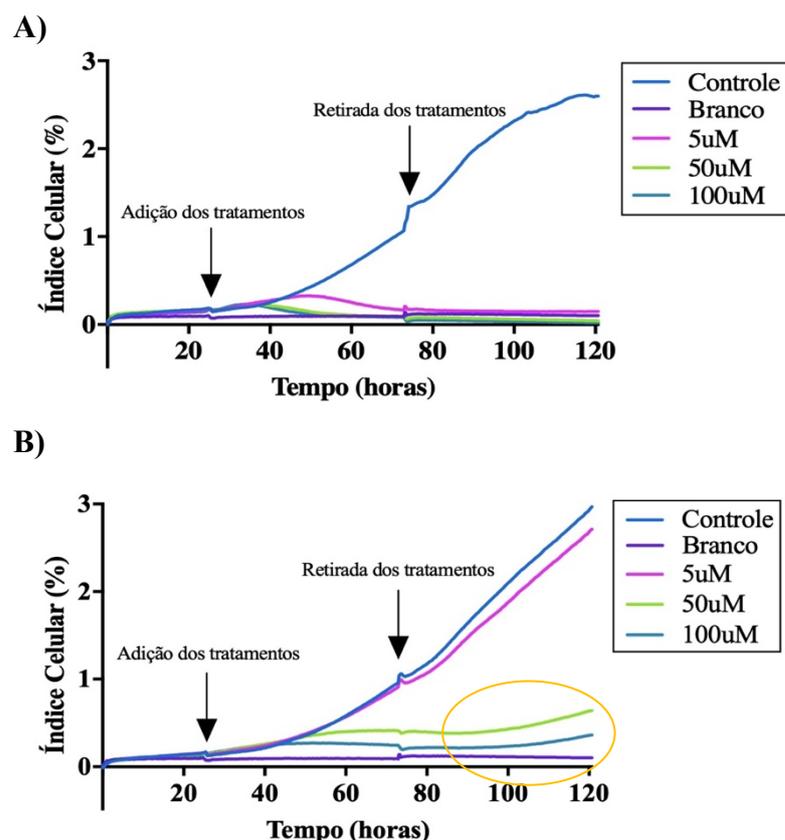


Figura 13 – Análise de crescimento em tempo real com exposição à L-OHP por 48 horas. (A) Curva de crescimento da linhagem HCT116-S em tempo real; (B) Curva de crescimento da linhagem HCT116-R em tempo real. Índice celular: valor número representando a impedância elétrica medida pelas células em contato com os microeletrodos presentes na microplaca. Círculo amarelo: indicação de mudança no estado de latência. Os valores estão representados como média de triplicata de três experimentos independentes.

Quanto à formação de esferas tumorais, na Figura 14A é possível observar as fotomicrografias dos esferóides com 4 dias de crescimento, seguido do mesmo esferóide 3 dias após a adição de cada tratamento, totalizando 7 dias de crescimento. Após a exposição às concentrações mais altas de L-OHP (50 e 100 μM), é possível observar uma redução nos esferóides da linhagem HCT116-S, onde pode-se ver a presença de um anel de células mortas em volta de um pequeno esferóide, o que não foi observado nas células HCT116-R.

Como demonstrado na Figura 14B, após a exposição a L-OHP, os esferóides das células HCT116-S tiveram uma redução estatisticamente significativa no valor percentual da sua área total para os grupos expostos a 50 e 100 μM de L-OHP, comparado com o dia 4 (antes do tratamento), só foi obtido um aumento da área total dos esferóides para grupo controle, com 29% de aumento. Para os demais grupos da linhagem HCT116-S obteve-se uma taxa de redução significativamente diferente do grupo controle, sendo: 3% para o grupo exposto à L-OHP 5 μM ,

64% para o grupo 50 μM de L-OHP, e 70% de redução para o grupo 100 μM . Os esferoides expostos à altas concentrações de L-OHP (50 e 100 μM) apresentaram uma taxa de redução estatisticamente semelhante.

Em contrapartida, as células HCT116-R não tiveram uma redução significativa da área total em nenhum dos grupos em relação ao dia 4 (100%). Quando comparado entre os grupos do dia 7, obteve-se um aumento semelhante da área para o grupo controle e 5 μM de 22% e 12%, respectivamente. Já os grupos expostos à L-OHP 50 e 100 μM , obteve-se uma redução de 17% e 18%, respectivamente.

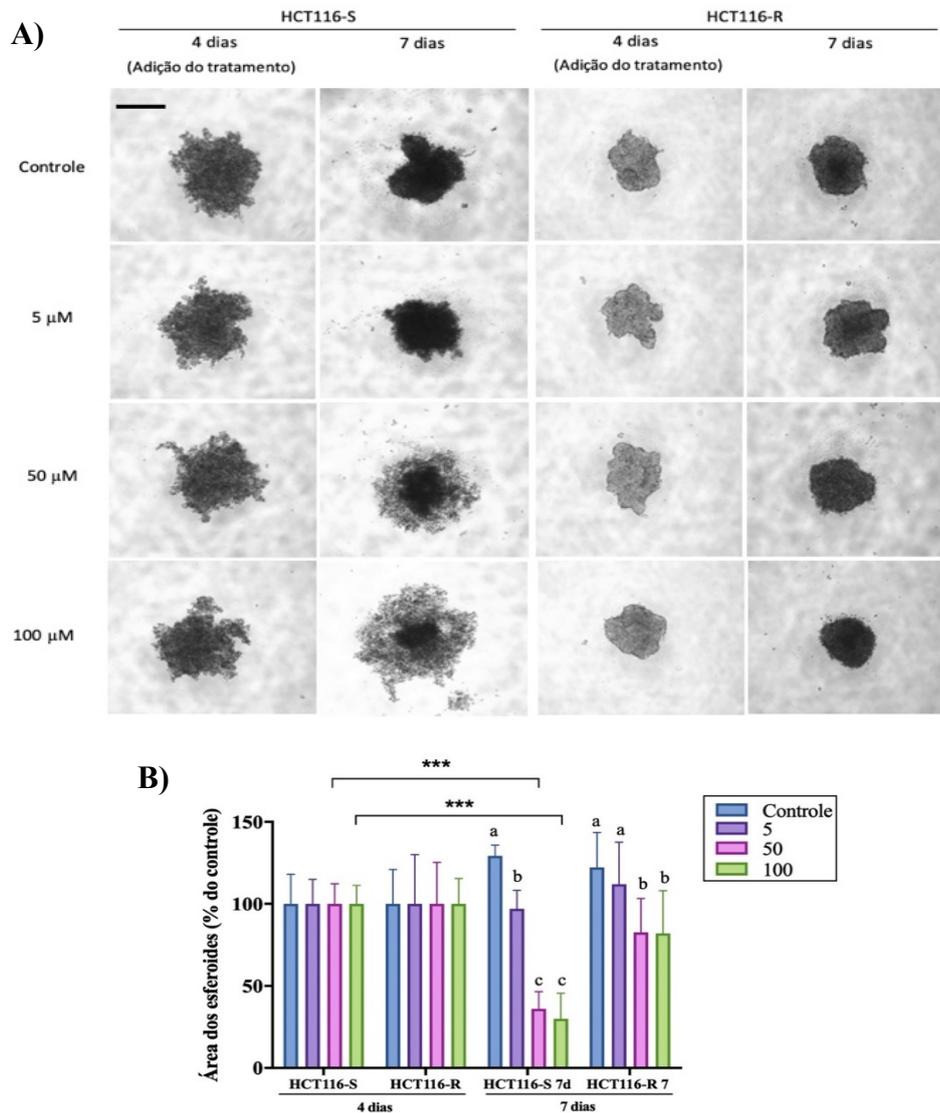


Figura 14 - Ensaio de formação de esferas. A) Fotomicrografias dos esferoides das linhagens HCT116-S e HCT116-R expostas à diferentes concentrações de L-OHP. É possível observar um anel de células mortas em volta de um pequeno esferoide na linhagem HCT116-S expostas à 50 e 100 μM de L-OHP. Barra de escala: 200 μm . B) Percentual da área dos esferoides 4 dias antes de tratados e 3 dias após exposição à diferentes concentrações de L-OHP, total de 7 dias de crescimento dos esferoides. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata

de três experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença estatística intragrupo. ***P<0,001.

Na Figura 15 está representada a análise da morte celular das linhagens HCT116-S e HCT116-R expostas à diferentes concentrações de L-OHP por 48 horas. Os resultados são apresentados como desvio padrão (\pm DP) de dois experimentos independentes. A exposição à L-OHP causou apoptose na linhagem celular HCT116-S, com (Q2 e Q3) de 4,24% (\pm 2,41), 23,92% (\pm 0,46), 41,35% (\pm 6,15) e 39,50 (\pm 10,75) após 48 horas de tratamento com L-OHP 0, 5, 50 e 100 μ M, respectivamente. A HCT116-R apresentou maior viabilidade celular (Q4) e baixa taxa de apoptose (Q2 e Q3) independente da concentração de L-OHP utilizada, sendo 7,99 % (\pm 1,60), 5,67 % (\pm 2,61), 10,64 % (\pm 0,27) e 15,67 (\pm 0,11) para 0, 5, 50 e 100 μ M, respectivamente. Esses resultados corroboraram os ensaios de viabilidade anteriores e sugeriram uma resistência significativa da linha celular HCT116-R contra L-OHP, que parece ter desenvolvido mecanismos para evitar a apoptose.

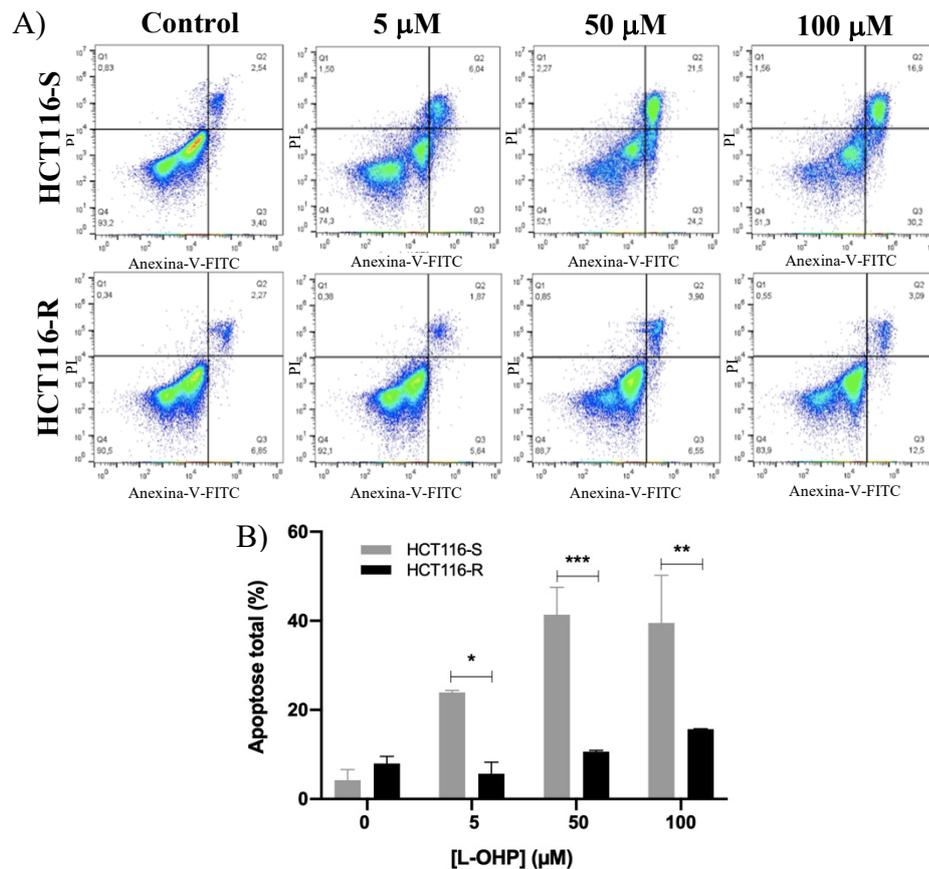


Figura 15 - Análise de morte celular por citometria de fluxo. (A) O perfil de morte celular para as linhagens de células HCT116-S e HCT116-R expostas à diferentes concentrações de L-OHP por 48 horas; (B) Análise de apoptose total (Q2 e Q3). Os resultados são apresentados como média \pm DP de duplicatas de dois experimentos independentes. ANOVA two-way: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

O ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo demonstrou uma forte dose-resposta a apoptose precoce com o aumento da exposição a L-OHP (Figura 16). Houve um aumento da proporção de células na fase G0/G1 na linhagem células HCT116-R quando comparadas com células HCT116-S. Para HCT116-S os valores foram 39,45% ($\pm 4,31$), 18,90% ($\pm 0,57$), 14,75% ($\pm 1,48$), 17,70% ($\pm 0,57$); e para HCT116-R, 43,10% ($\pm 1,56$), 39,75% ($\pm 1,48$), 49,60% ($\pm 0,85$), 33,90% ($\pm 0,42$), após um tratamento de 48 horas com L-OHP 0, 5, 50 e 100 μM , respectivamente.

A linhagem HCT116-R não apresentou células na fase sub-G1 no grupo controle e no grupo L-OHP 5 μM , 3,61% ($\pm 1,30$) no grupo L-OHP 50 μM , 6,88% ($\pm 0,02$) no grupo L-OHP 100 μM , após 48 horas de tratamento. Ao contrário das células HCT116-R, a porcentagem de células na fase sub-G1 é significativamente aumentada para células HCT116-S tratadas com L-OHP, como segue: 1,13% ($\pm 0,66$), 31,50% ($\pm 3,82$), 40,40% ($\pm 5,23$), 33,50% ($\pm 2,26$), após um tratamento de 48 horas com L-OHP 0, 5, 50 e 100 μM , respectivamente.

A proporção de células HCT116-R na fase G2/M aumentou após exposição a L-OHP 100 μM quando comparada com as outras concentrações, como segue: 23,65% ($\pm 14,35$), 14,35% ($\pm 1,91$), 23,15% ($\pm 0,78$), e 44,35% ($\pm 18,60$), após 48 horas de tratamento com L-OHP 0, 5, 50 e 100 μM , respectivamente. Por fim, é possível inferir que o padrão do ciclo celular do HCT116-R tratado com L-OHP na concentração de 5 μM e 50 μM permanece semelhante ao grupo controle.

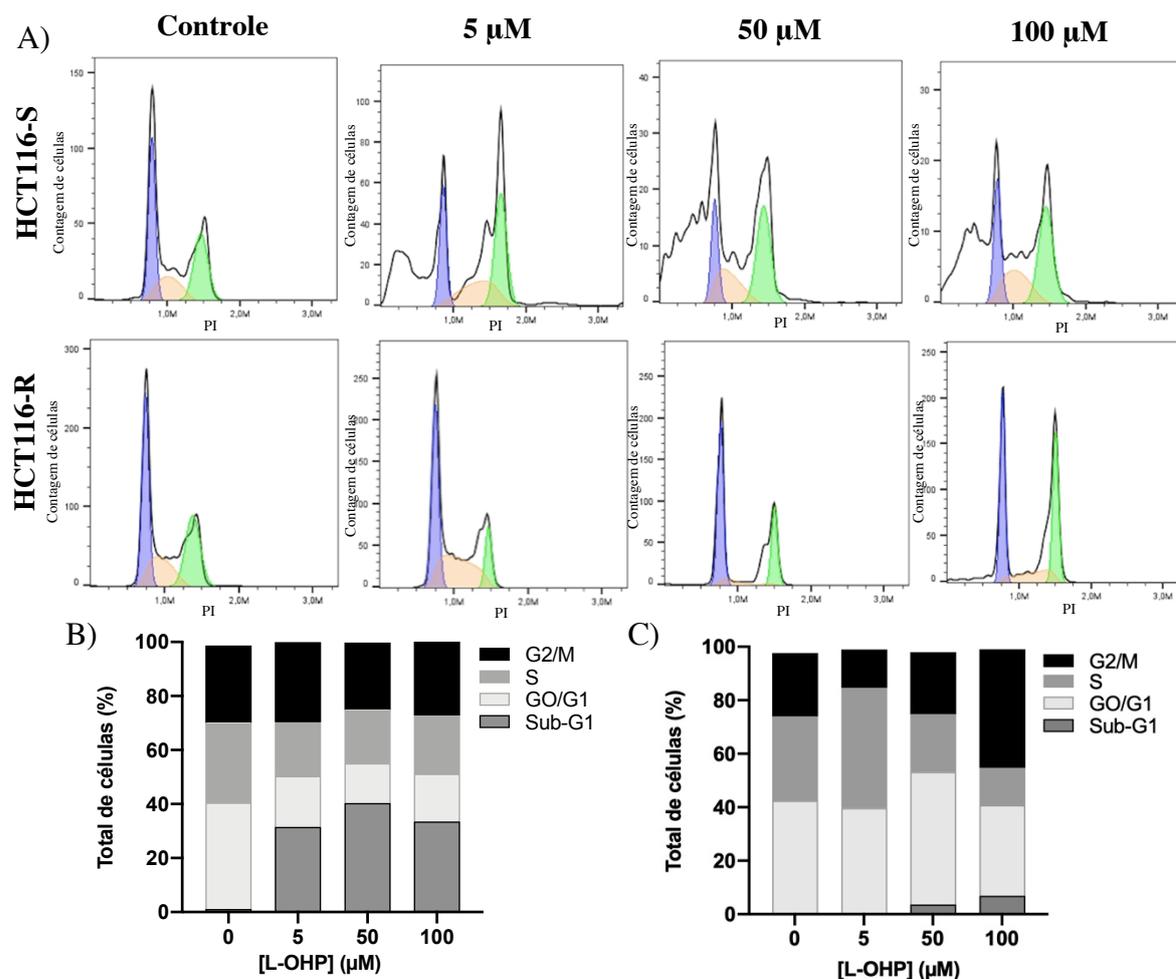


Figura 16 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. (A) Perfil do ciclo celular para as linhagens de células HCT116-S e HCT116-R expostas a diferentes concentrações de L-OHP por 48 horas. O pico azul representa a fase G0/G1; o pico laranja representa a fase S, e o pico verde representa a fase G2/M; (B) Linhagem celular HCT116-S tratada com diferentes concentrações de L-OHP; (C) Linhagem celular HCT116-R tratada com diferentes concentrações de L-OHP. Os resultados são apresentados como a média de duplicatas de dois experimentos independentes.

4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA PARA 50% DAS CÉLULAS

A análise de viabilidade após o tratamento com os fármacos isolados (curcumina livre, NLSC e TFD) para cada linhagem estão representados na Figura 17. O efeito da curcumina livre (CURC) e a NLSC sobre a viabilidade celular é semelhante tanto para a linhagem HCT116-S, quanto para a linhagem HCT116-R (Figura 17A). Esse mesmo comportamento foi encontrado após tratamento com TFD (Figura 17B).

Os valores de IC50 para cada tratamento estão representados na Figura 17C, onde temos para HCT116-S: (CURC): $7,2 \pm 0,6$ µM; (NLSC): $7,1 \pm 1,3$ µM; e (TFD): $4,4 \pm 0,2$ µM, correspondente à concentração da NE-AICIFt nas condições utilizadas. Já para a linhagem

HCT116-R, temos: (CURC): $5,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$; (NLSC): $9,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$; e (TFD): $5,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$. O valor encontrado para a curcumina livre e a NLSC para as células HCT116-S foi semelhante, já as células HCT116-R foram mais sensibilizadas pela curcumina livre do que a forma nanoestruturada ($P < 0,05$).

Vale ressaltar que os valores de IC_{50} calculados para a NLS foram significativamente diferentes em relação aos valores encontrados para a NLSC tanto na linhagem sensível ($7,1 \pm 1,3 \mu\text{M}$ para NLSC e $11,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ para NLS, $P < 0,05$) e quanto na linhagem resistente ($9,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ para NLSC e $19,45 \pm 2,7 \mu\text{M}$ para NLS, $P < 0,0001$). Porém, isso mostra que em concentrações maiores que o valor de IC_{50} para a NLSC pode-se ter uma toxicidade associada aos componentes presentes na formulação.

O grupo controle do veículo da curcumina (DMSO) e da L-OHP (água) não apresentou nenhuma alteração da viabilidade em relação ao controle exposto somente à meio. As células expostas somente à NE-AICIFt, sem exposição ao LED, também não tiveram nenhuma alteração em sua viabilidade.

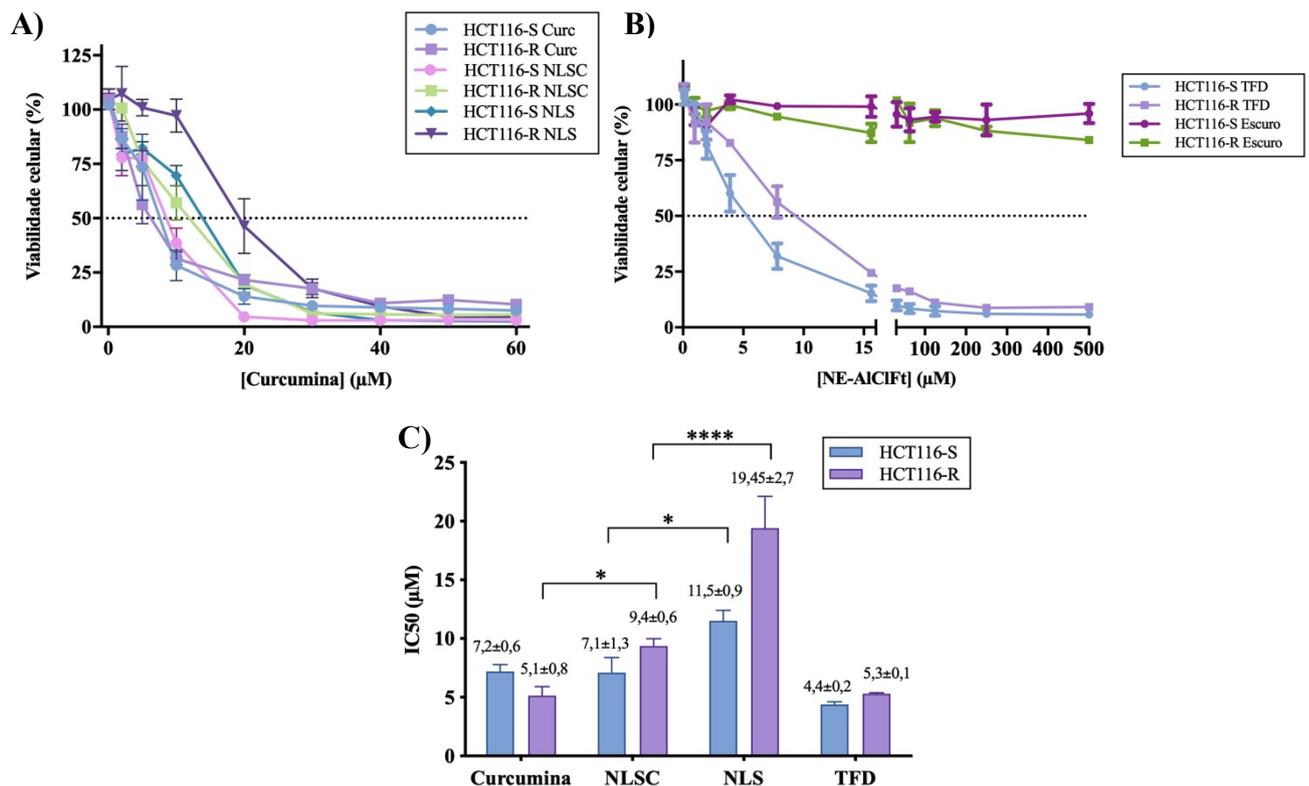


Figura 17 - Determinação da concentração inibitória para 50% das células de cada tratamento individualmente. (A) Viabilidade celular da curcumina livre e curcumina nanoestruturada. (B) Viabilidade celular da terapia fotodinâmica mediada pela NE-AICIFt. (C) Valores de IC_{50} obtidos para cada tratamento. NLS: nanopartículas lipídicas sólidas vazias/branco; NLSC: nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina; Curc: curcumina livre; TFD: terapia fotodinâmica mediada pela NE-AICIFt, seguido da exposição ao LED; Escuro: células expostas somente a NE-AICIFt, sem exposição ao LED. Os valores estão representados como média e

EPM de triplicata de três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,05; ****P<0,0001.

4.3. ENSAIOS COMBINATÓRIOS

4.3.1. ANÁLISE DO EFEITO SINÉRGICO

A taxa de inibição observada para cada combinação testada nas linhagens HCT116-S e HCT116-R está representada na Figura 18, onde é possível notar uma clara dose-dependência em ambas as linhagens. O uso das NLSC nas concentrações mais elevadas possui uma alta taxa de inibição sempre >81% para HCT116-S e >77% para HCT116-R, independente do uso isolado ou combinatório. Esse comportamento também foi observado para a curcumina livre, mas com taxas de inibição um pouco menores do que sua forma nanoestruturada, sendo >78% para HCT116-S e >55% para HCT116-R.

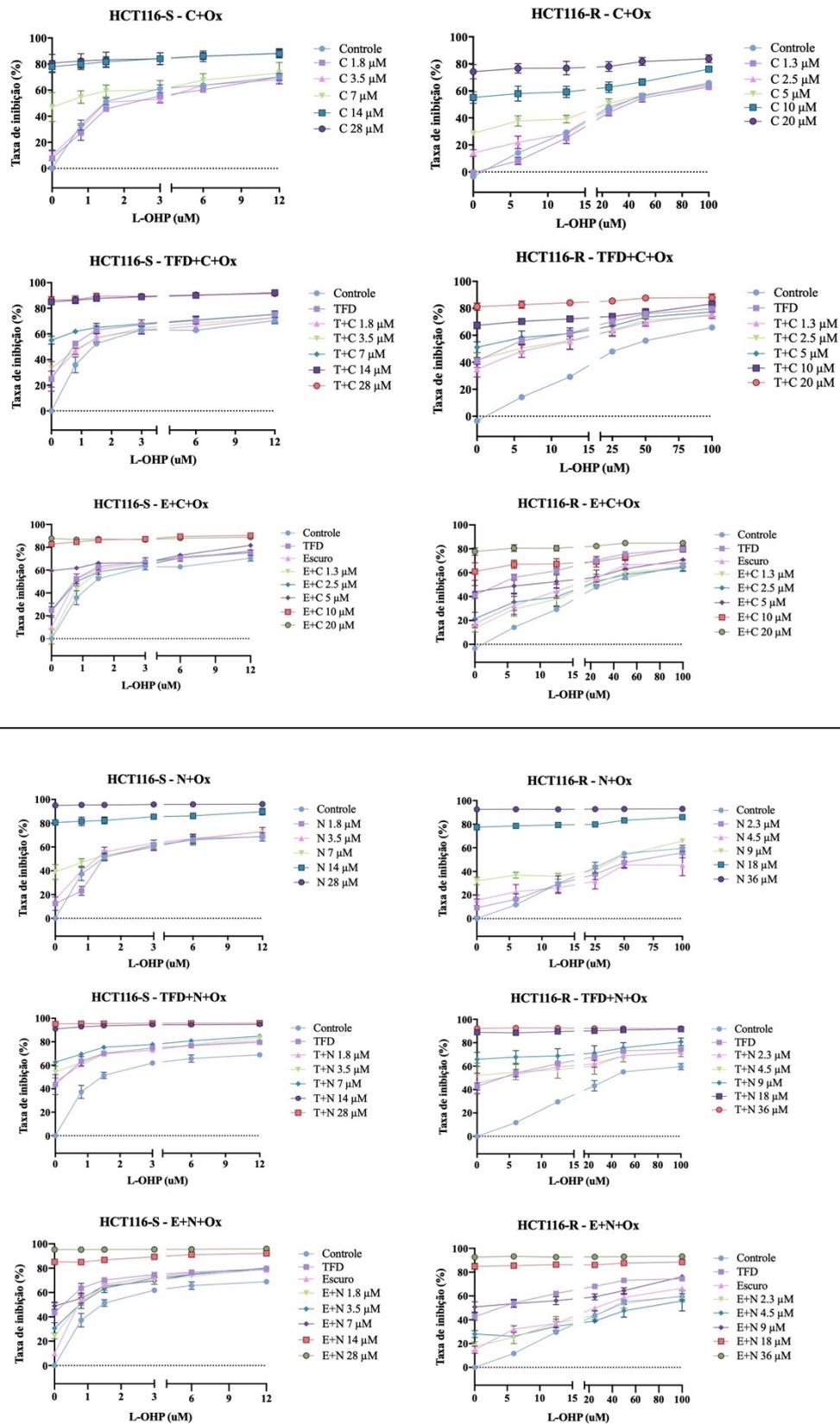


Figura 18 – Taxa de inibição 48 horas após exposição à diferentes combinações terapêuticas, utilizando concentrações 0,25x(IC50), 0,5(IC50), IC50, 2x(IC50) e 4x(IC50) de cada tratamento. C: curcumina livre; Ox ou L-OHP: oxaliplatina livre; N ou NLSC: nanopartícula lipídica contendo curcumina; TFD: terapia fotodinâmica mediada pela NE-

CIAIFt na concentração de IC50; Escuro: exposição somente a NE-CIAIFt na concentração de IC50. Os gráficos estão divididos nos grupos (Curcumina): células expostas somente às combinações de curcumina e L-OHP; (NLSC): células expostas somente às combinações de NLSC e L-OHP; (TFD+C+Ox): células pré-sensibilizadas com TFD e expostas por 48 horas à curcumina e/ou L-OHP; TFD+N+Ox: células pré-sensibilizadas com TFD e expostas por 48 horas a nanopartícula de curcumina e/ou L-OHP; (E+C+Ox): células expostas somente à NE-AICIFt, seguido da incubação por 48 horas à curcumina e/ou L-OHP; (E+N+Ox): células expostas somente à NE-AICIFt, seguido da incubação por 48 horas à NLSC e/ou L-OHP. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes.

Os valores do índice de combinação (CI) estão representados na Figura 19, onde pode-se observar que o pré-tratamento com TFD sensibiliza as células para que se tenha mais pontos de sinergismo ($CI < 0,9$), ou seja, um maior efeito dos tratamentos combinados do que seu uso isolado. Os principais valores obtidos por meio do ensaio do efeito sinérgico estão representados na Tabela 2, onde se levou em consideração a combinação com concentrações de L-OHP de $0,25 \times IC_{50}$, $0,5 \times IC_{50}$, visando manter uma alta eficácia e reduzir a toxicidade associada ao uso de altas concentrações da quimioterápico.

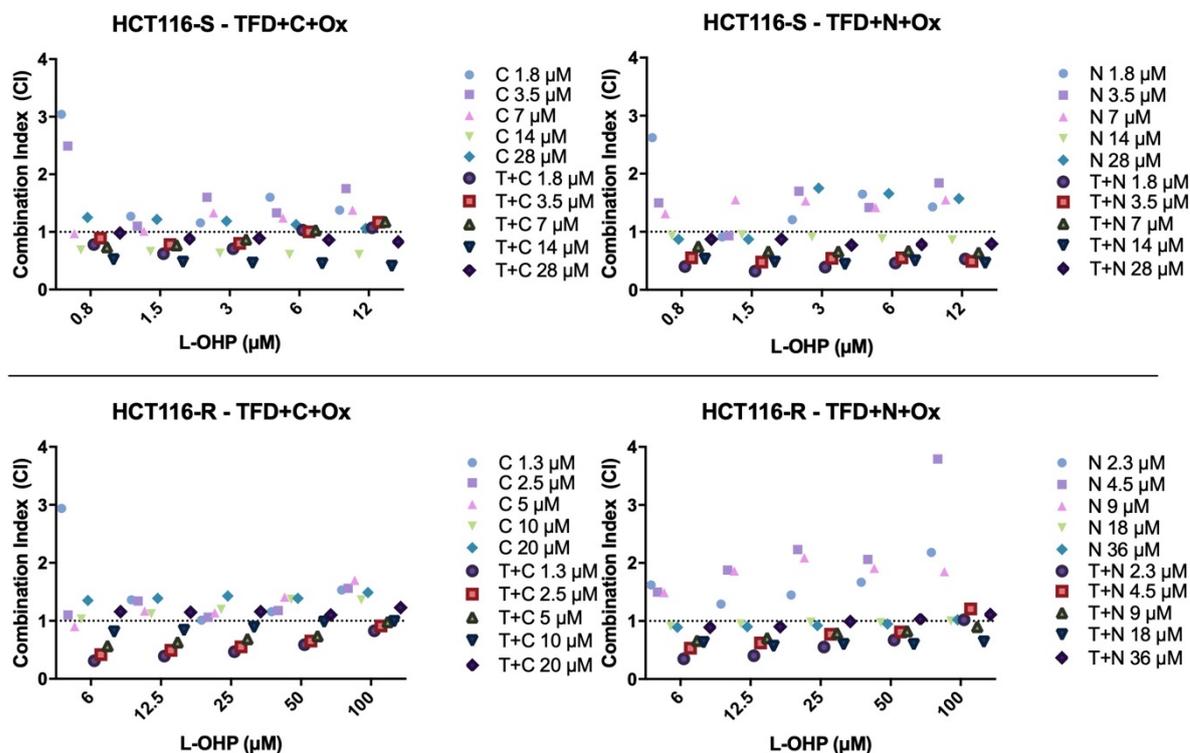


Figura 19 – Valores obtidos de índice de combinação após as diferentes combinações terapêuticas para as linhagens HCT116-S e HCT116-R. CI: índice de combinação (do inglês: combination index); C: curcumina; T: terapia fotodinâmica; N: nanopartícula lipídica sólida contendo curcumina; (TFD+C+Ox): células pré-sensibilizadas com TFD e expostas por 48 horas à curcumina e/ou L-OHP; TFD+N+Ox: células pré-sensibilizadas com TFD e expostas por 48 horas a nanopartícula de curcumina e/ou L-OHP; (E+C+Ox): células expostas somente

à NE-AIClFt, seguido da incubação por 48 horas à curcumina e/ou L-OHP; (E+N+Ox): células expostas somente à NE-AIClFt, seguido da incubação por 48 horas à NLSC e/ou L-OHP. Os valores estão representados como média de triplicata de três experimentos independentes.

Tabela 2 – Resumo dos principais dados obtidos com o ensaio de sinergismo por meio do software livre CompuSyn. Fa: Fração afetada ou fração de inibição; CI: índice celular; L-OHP: oxaliplatina; Curc: curcumina livre; NLSC: nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina; TFD: terapia fotodinâmica mediada pela NE-AIClFt, seguido da exposição ao LED; (+): aplicação da TFD; (-): sem aplicação da TFD. Antagonismo: CI>1,1; Aditividade: CI=0,9-1,1; Sinergismo: CI<0,9. Em amarelo estão destacados os grupos de tratamentos escolhidos para utilização neste trabalho.

| Linhagem | Composto/Tratamento | | | | Fa | CI | Tipo de interação |
|----------|---------------------|--------------------|--------------------|------|------|------------|-------------------|
| | L-OHP (μ M) | Curc (μ M) | NLSC (μ M) | TFD | | | |
| HCT116-S | 0,8 | 1,8 | | - | 0,27 | 3,04 | Antagonismo |
| | 0,8 | 1,8 | | + | 0,46 | 0,78 | Sinergismo |
| | 0,8 | 3,5 | | - | 0,31 | 0,97 | Aditividade |
| | 0,8 | 3,5 | | + | 0,48 | 0,89 | Sinergismo |
| | 0,8 | 7 | | - | 0,55 | 0,97 | Aditividade |
| | 0,8 | 7 | | + | 0,62 | 0,74 | Sinergismo |
| | 0,8 | 14 | | - | 0,80 | 0,69 | Sinergismo |
| | 0,8 | 14 | | + | 0,86 | 0,52 | Sinergismo |
| | 0,8 | | 1,8 | - | 0,29 | 2,62 | Antagonismo |
| | 0,8 | | 1,8 | + | 0,60 | 0,40 | Sinergismo |
| | 0,8 | | 3,5 | - | 0,40 | 1,50 | Antagonismo |
| | 0,8 | | 3,5 | + | 0,62 | 0,55 | Sinergismo |
| | 0,8 | | 7 | - | 0,52 | 1,31 | Antagonismo |
| | 0,8 | | 7 | + | 0,69 | 0,75 | Sinergismo |
| | 1,5 | 1,8 | | - | 0,46 | 1,27 | Antagonismo |
| | 1,5 | 1,8 | | + | 0,57 | 0,62 | Sinergismo |
| | 1,5 | 3,5 | | - | 0,51 | 1,10 | Antagonismo |
| | 1,5 | 3,5 | | + | 0,57 | 0,78 | Sinergismo |
| | 1,5 | 7 | | - | 0,59 | 1,01 | Aditividade |
| | 1,5 | 7 | | + | 0,65 | 0,77 | Sinergismo |
| 1,5 | 14 | | - | 0,82 | 0,66 | Sinergismo | |

| | | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|---|------|------|-------------|
| | 1,5 | 14 | | + | 0,88 | 0,48 | Sinergismo |
| | 1,5 | | 1,8 | - | 0,52 | 0,91 | Aditividade |
| | 1,5 | | 1,8 | + | 0,70 | 0,32 | Sinergismo |
| | 1,5 | | 3,5 | - | 0,56 | 0,93 | Aditividade |
| | 1,5 | | 3,5 | + | 0,70 | 0,48 | Sinergismo |
| | 1,5 | | 7 | - | 0,53 | 1,55 | Antagonismo |
| | 1,5 | | 7 | + | 0,75 | 0,66 | Sinergismo |
| | 6 | 1,3 | | - | 0,08 | 2,94 | Antagonismo |
| | 6 | 1,3 | | + | 0,48 | 0,31 | Sinergismo |
| | 6 | 2,5 | | - | 0,22 | 1,10 | Antagonismo |
| | 6 | 2,5 | | + | 0,50 | 0,42 | Sinergismo |
| | 6 | 5 | | - | 0,38 | 0,90 | Aditividade |
| | 6 | 5 | | + | 0,58 | 0,57 | Sinergismo |
| | 6 | 10 | | - | 0,58 | 1,03 | Antagonismo |
| | 6 | 10 | | + | 0,70 | 0,81 | Sinergismo |
| | 6 | | 2,3 | - | 0,16 | 1,62 | Antagonismo |
| | 6 | | 2,3 | + | 0,53 | 0,35 | Sinergismo |
| | 6 | | 4,5 | - | 0,23 | 1,50 | Antagonismo |
| | 6 | | 4,5 | + | 0,55 | 0,53 | Sinergismo |
| HCT116-R | 6 | | 9 | - | 0,37 | 1,49 | Antagonismo |
| | 6 | | 9 | + | 0,68 | 0,66 | Sinergismo |
| | 12,5 | 1,3 | | - | 0,25 | 1,36 | Antagonismo |
| | 12,5 | 1,3 | | + | 0,55 | 0,39 | Sinergismo |
| | 12,5 | 2,5 | | - | 0,28 | 1,34 | Antagonismo |
| | 12,5 | 2,5 | | + | 0,56 | 0,49 | Sinergismo |
| | 12,5 | 5 | | - | 0,39 | 1,17 | Antagonismo |
| | 12,5 | 5 | | + | 0,61 | 0,63 | Sinergismo |
| | 12,5 | 10 | | - | 0,59 | 1,12 | Antagonismo |
| | 12,5 | 10 | | + | 0,72 | 0,84 | Sinergismo |
| | 12,5 | | 2,3 | - | 0,29 | 1,29 | Antagonismo |
| | 12,5 | | 2,3 | + | 0,59 | 0,40 | Sinergismo |
| | 12,5 | | 4,5 | - | 0,26 | 1,88 | Antagonismo |

| | | | | | |
|------|-----|---|------|------|-------------|
| 12,5 | 4,5 | + | 0,57 | 0,62 | Sinergismo |
| 12,5 | 9 | - | 0,36 | 1,86 | Antagonismo |
| 12,5 | 9 | + | 0,69 | 0,71 | Sinergismo |

4.3.2. ENSAIO DE VIABILIDADE

A análise de viabilidade celular está demonstrada na Figura 20, onde pode-se observar que para a linhagem HCT116-S, além da L-OHP, os grupos combinatórios demonstraram melhor desempenho no que se refere ao percentual de inibição, os quais foram estatisticamente semelhantes: L-OHP (80,33%±2,96), L-OHP+CURC (88,33% ±2,40), TFD+L-OHP (89,67% ±1,67), TFD+CURC (84,00% ±1,16) e TFD+L-OHP+CURC (88,67% ±2,60).

Para a linhagem HCT116-R, os grupos combinatórios tiveram uma taxa de inibição estatisticamente semelhante após 48 horas de exposição aos tratamentos, sendo: L-OHP+CURC (71,33% ±3,71), TFD+L-OHP (80,67% ±2,03), TFD+CURC (82,00% ±1,00) e TFD+L-OHP+CURC (85,67% ±0,67), já os demais grupos apresentaram taxas de inibição mais reduzidas.

Nesse sentido, na Figura 20, é possível observar um papel importante dos tratamentos combinatórios na redução da viabilidade celular para ambas as linhagens.

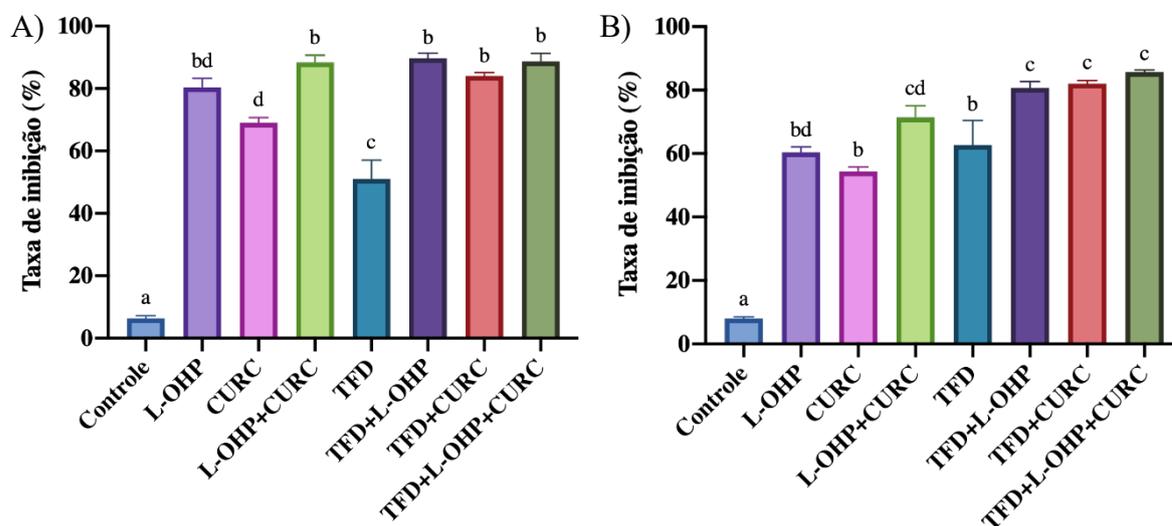


Figura 20 - Ensaio de viabilidade celular após 48 horas. Os valores dos tratamentos para cada linhagem foram correspondentes ao descrito na Tabela 1. (A) Linhagem HCT116-S. (B) Linhagem HCT116-R. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes. ANOVA one-way: letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.

4.3.3. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNICAS

Ao avaliar a capacidade das células em formarem colônias (Figura 21) após os tratamentos, foi observado que para a linhagem HCT116-S houve uma taxa de inibição da clonogenicidade estatisticamente semelhante para todos os grupos de tratamento, exceto para o grupo TFD (47,89% ±8,62 de inibição), sendo: L-OHP (85,52% ±4,37), CURC (87,76% ±2,73), L-OHP+CURC (98,92% ±0,22), TFD+L-OHP (96,49% ±1,05), TFD+CURC (86,01% ±1,01), e TFD+L-OHP+CURC (98,75% ±0,40).

A linhagem HCT116-R apresentou uma menor capacidade de formação de colônias, quando exposta aos tratamentos combinatórios. As maiores taxas de inibição foram observadas para os grupos L-OHP+CURC (79,67% ±2,96), TFD+L-OHP (68,99% ±0,59) e TFD+L-OHP+CURC (82,85% ±0,80), os quais foram estatisticamente semelhantes, demonstrando um papel importante das combinações utilizadas na redução da capacidade de sobrevivência e clonogenicidade das células resistentes.

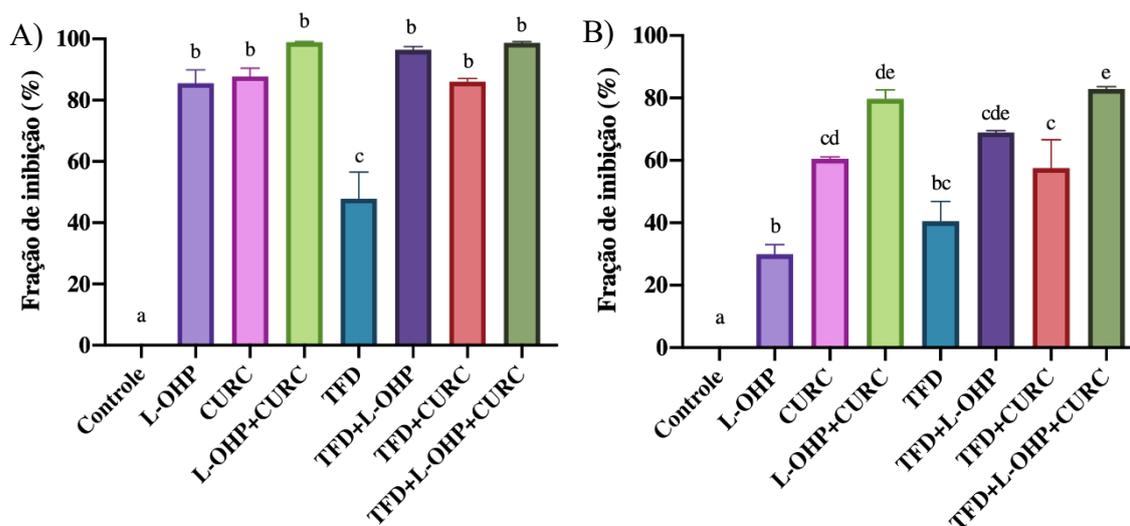


Figura 21 - Ensaio de formação de colônias. (A) Linhagem HCT116-S. (B) Linhagem HCT116-R. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes. ANOVA one-way: letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.

4.3.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO – SCRATCH ASSAY

A avaliação da capacidade migratória das células quando expostas aos tratamentos está representada na Figura 22, assim como as fotomicrografias representando a migração celular de cada grupo nos tempos de 0h, 24h e 48h para a linhagem HCT116-S (Figura 23) e para a linhagem HCT116-R (Figura 24).

Após 48 horas de exposição, a linhagem HCT116-S apresentou taxa de migração menor e estatisticamente semelhantes para os grupos de tratamentos: TFD+CURC+L-OHP (25,00% ±5,13), TFD+CURC (33,67% ±4,33), L-OHP+CURC (38,00% ±6,56), TFD (39,67% ±2,73) e CURC (39,67% ±5,78), diferindo do controle (60,33% ±8,11). Enquanto os grupos TFD+L-OHP (45,67% ±2,60) e L-OHP (56,33% ±6,36) apresentaram uma taxa de migração estatisticamente semelhante ao grupo controle sem tratamento.

Para a linhagem HCT116-R, após 48 horas de exposição aos tratamentos, foi observado que o grupo TFD+CURC+L-OHP (28,67% ±2,19) foi o único que apresentou diferença estatística em relação ao grupo Controle (43,33% ±2,96), enquanto os demais grupos apresentaram uma taxa de migração estatisticamente semelhante ao observado para o grupo controle. No geral, os grupos TFD+CURC+L-OHP (28,67% ±2,19) e TFD+L-OHP (29,67% ±4,70) apresentaram uma taxa de migração mais reduzida, seguido de L-OHP+CURC (38,00% ±3,79), CURC (39,00% ±7,00), L-OHP (40,33% ±0,88), TFD (42,33% ±4,67) e TFD+CURC (44,00% ±4,04).

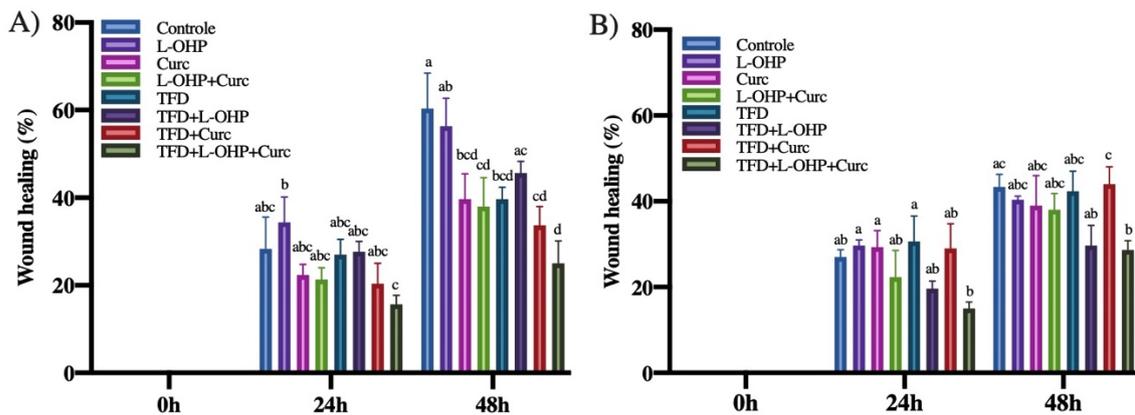


Figura 22 - Ensaio de migração celular. (A) Linhagem HCT116-S. (B) Linhagem HCT116-R. Wound healing: cicatrização de ferida. Os valores estão representados como média e EPM de triplicata de três experimentos independentes. ANOVA one-way: letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.

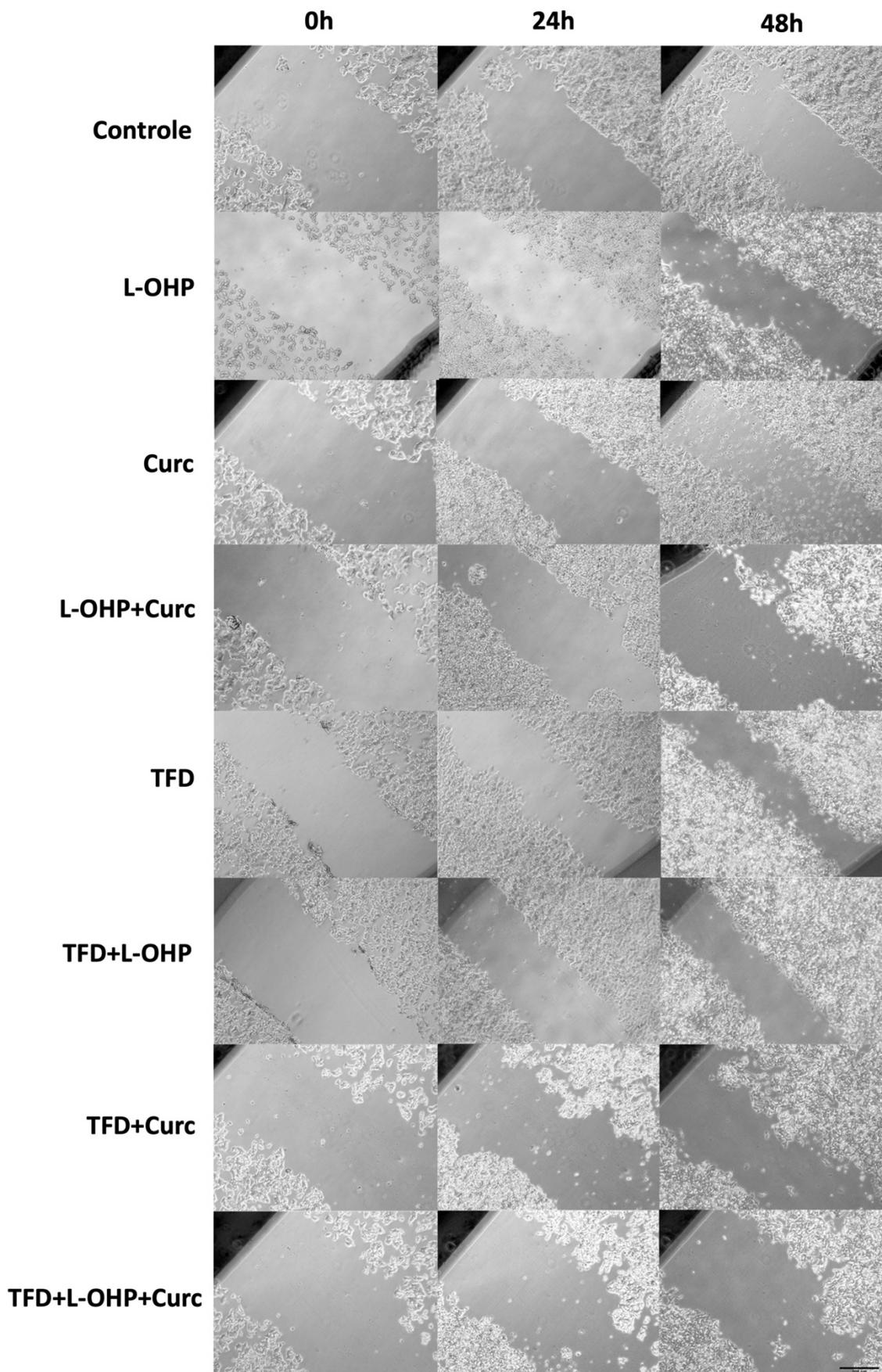


Figura 23 - Fotomicrografias representando o ensaio de migração celular para a células HCT116-S. Aumento: 10x. Barra de escala: 200 µm.

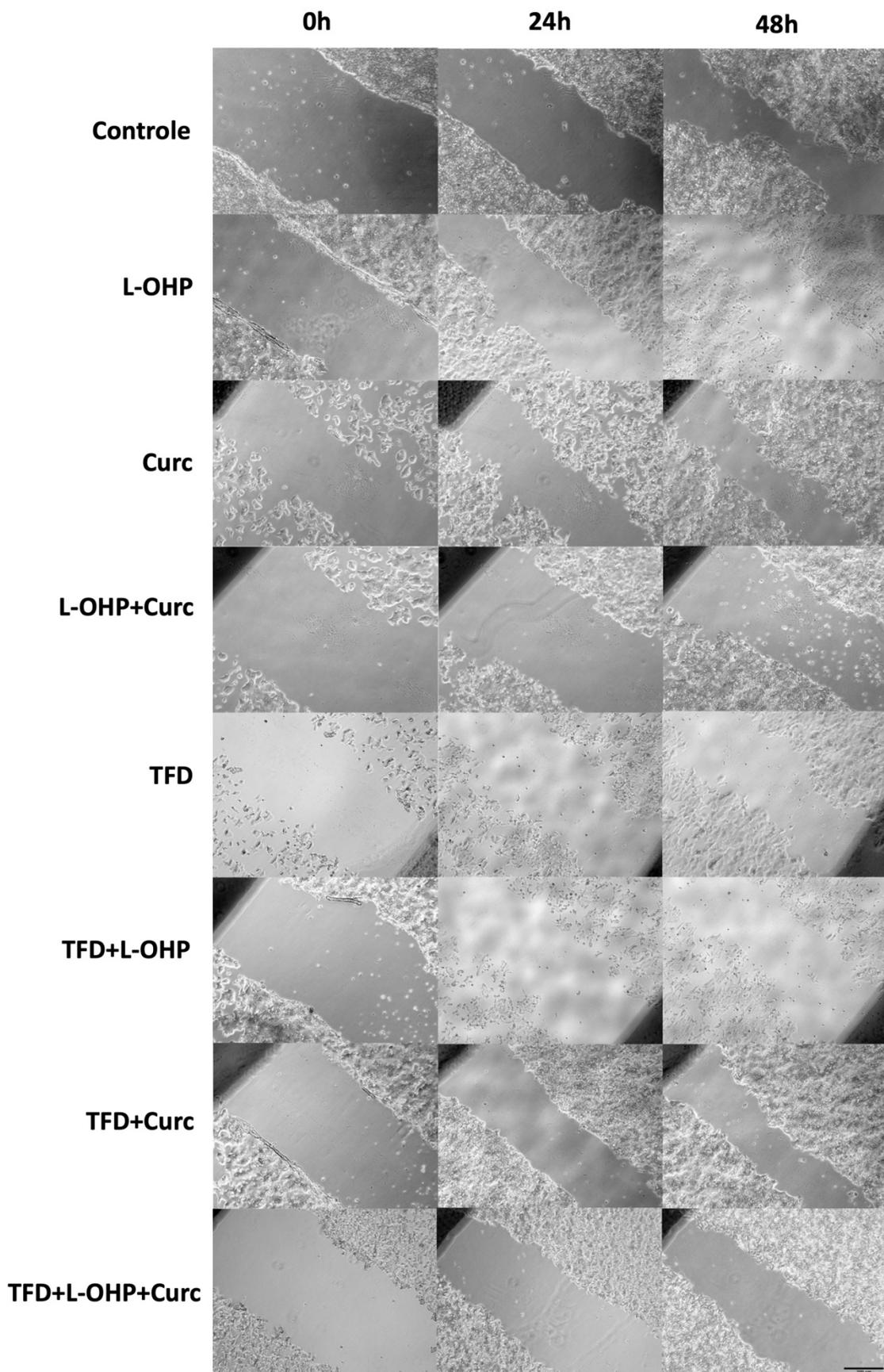


Figura 24 - Fotomicrografias representando o ensaio de migração celular para a células HCT116-R. Aumento: 10x. Barra de escala: 200 μ m.

4.3.5. ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM TEMPO REAL

A curva do ensaio de migração em tempo real demonstrou uma diferença no padrão de cada linhagem quando expostas aos tratamentos por 48 horas, conforme representado na Figura 25.

Para a linhagem HCT116-S, pode-se observar que os grupos que apresentaram um índice celular final (ao final das 48 horas) mais elevado ($>0,2$) foram: Controle ($0,36 \pm 0,02$), CURC ($0,51 \pm 0,03$), TFD ($0,27 \pm 0,03$) e TFD+CURC ($0,80 \pm 0,13$) (Figura 25C). Dentre esses grupos o grupo TFD+CURC apresentou o maior índice celular, o qual foi significativamente diferente de todos os outros, enquanto os grupos Controle, CURC e TFD foram estatisticamente semelhantes. Além disso, os grupos L-OHP ($-0,29 \pm 0,02$), L-OHP+L-OHP ($-0,24 \pm 0,002$), TFD+L-OHP ($-0,29 \pm 0,04$) e TFD+CURC+L-OHP ($-0,19 \pm 0,02$) apresentaram índice celular final negativo e estatisticamente semelhantes, portanto, indicando que não houve uma migração efetiva para esses grupos.

Já para a linhagem HCT116-R, não foi observado índice celular negativo, mostrando que independente do tratamento utilizado houve um percentual de células migrando, sendo a menor taxa de migração para os grupos TFD+L-OHP ($0,08 \pm 0,03$), TFD+L-OHP+CURC ($0,30 \pm 0,04$), L-OHP ($0,38 \pm 0,20$), Controle ($0,55 \pm 0,01$), L-OHP+CURC ($0,58 \pm 0,005$) e TFD ($0,71 \pm 0,21$), respectivamente, entre os quais não foi encontrada diferença estatística significativa.

Semelhante ao observado para a linhagem HCT116-S, as células HCT116-R quanto tratadas com CURC ($1,04 \pm 0,27$) e TFD+CURC ($1,19 \pm 0,03$) apresentaram índice celular final mais elevado, sendo principalmente estatisticamente diferentes do grupo TFD+L-OHP (Figura 25D).

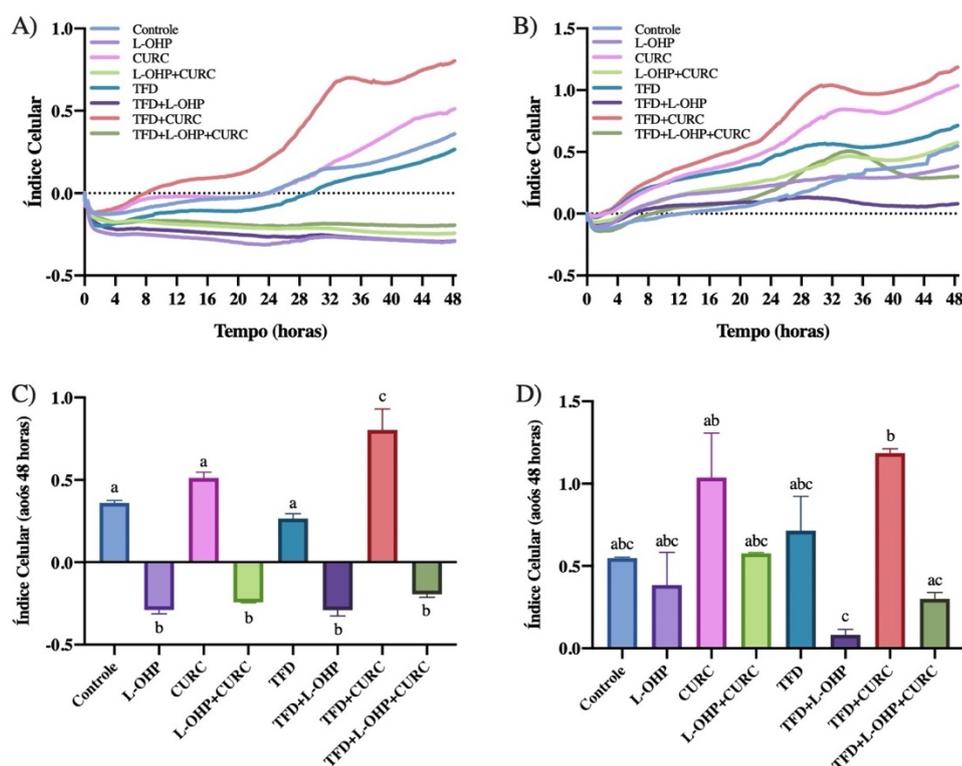


Figura 25 - Ensaio de migração em tempo real. (A) Migração em tempo real da linhagem HCT116-S. (B) Migração em tempo real da linhagem HCT116-R. (C) Índice celular final após 48 horas de exposição aos tratamentos para a linhagem HCT116-S. (D) Índice celular final após 48 horas de exposição aos tratamentos para a linhagem HCT116-R. Índice celular: valor número representando a impedância elétrica medida pelas células em contato com os microeletrodos presentes na parte inferior do poço superior da microplaca. Os valores estão representados como média e EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. ANOVA one-way: letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.

4.3.6. ENSAIO DE MORTE CELULAR EM TEMPO REAL

O ensaio de morte celular em tempo real está representado na Figura 26. De forma geral, pode-se observar que a cinética da luminescência, o qual representa a ligação da anexina-V com a fosfatidilserina presente na membrana (apoptose precoce), mostrou um perfil diferente para cada linhagem mediante exposição aos tratamentos. Já a cinética de fluorescência, a qual está ligado a integridade da membrana e é indicativo de células necróticas (apoptose tardia), apresentou um sinal basal e/ou reduzido para ambas as linhagens nas condições terapêuticas utilizadas nesse trabalho.

Ao correlacionar a AUC dos dados de RLU e RFU para a linhagem HCT116-S (Figura 26E), é possível observar os seguintes padrões de morte celular de acordo com a proporção das barras, citados a seguir da menor para maior intensidade:

- Apoptose precoce: CTRL -, TFD e CTRL +.
- Apoptose tardia: TFD+L-OHP e L-OHP.

- Células necróticas: CURC, L-OHP+CURC, TFD+CURC e TFD+L-OHP+CURC.

Por fim, ao correlacionar a AUC dos dados de RLU e RFU para a linhagem HCT116-R (Figura 26F), é possível observar os seguintes padrões de morte celular de acordo com a proporção das barras, citados a seguir da menor para maior intensidade:

- Apoptose precoce: CTRL -, L-OHP, TFD, CTRL + e TFD+L-OHP.
- Apoptose tardia: CURC e TFD+CURC.
- Células necróticas: L-OHP+CURC e TFD+L-OHP+CURC.

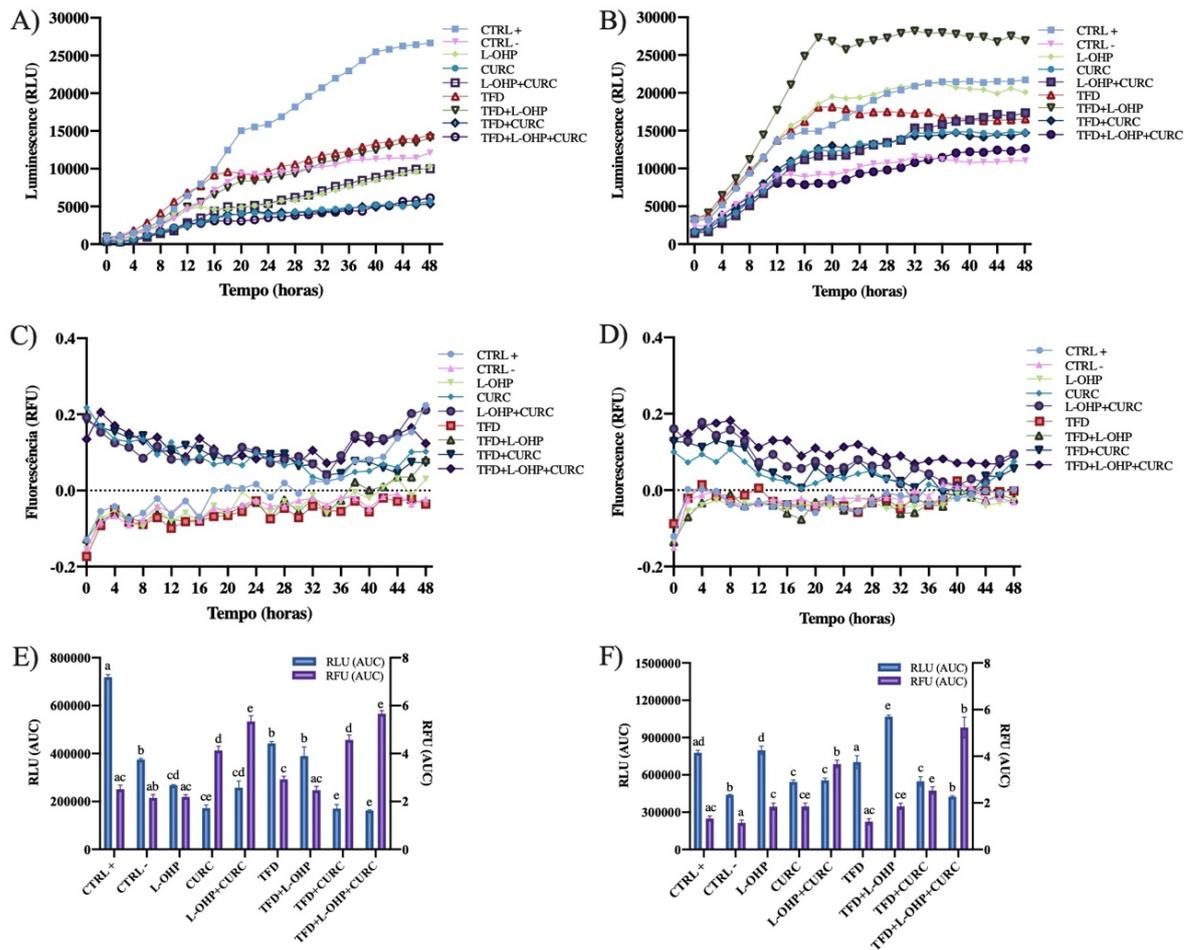


Figura 26 - Ensaio de morte celular em tempo real das linhagens HCT116-S e HCT116-R quanto expostas aos tratamentos por 48 horas utilizando o kit RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis. (A) Padrão cinético de luminescências células HCT116-S. (B) Padrão cinético de luminescência das células HCT116-R. (C) Padrão cinético de fluorescência das células HCT116-S. (D) Padrão cinético de fluorescência das células HCT116-R. (E) Análise da AUC do padrão cinético da RLU e RFU para HCT116-S. (F) Análise da AUC do padrão cinético da RLU e RFU para HCT116-R. Todos os gráficos de cinética estão representados como média de um experimento conduzido em duplicata. Os gráficos de AUC estão representados como média \pm DP. Sendo, RLU: unidade relativa de luminescência (do inglês relative light units), indicando ligação da Anexina V, relacionado ao perfil apoptótico; RFU: unidade relativa de fluorecência (do inglês relative fluorescence units), indicando a integridade de membrana, relacionado ao perfil necrótico; AUC: Área sob a curva (do inglês: area under

the curve), calculado a partir da cinética de cada marcador. ANOVA two-way: letras diferentes representam diferença estatística entre grupos da mesma linhagem.

4.3.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.3.7.1. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RNA TOTAL

Os dados de caracterização do RNA total dos grupos Controle das células HCT116-S (S_CTRL), Controle das células HCT116-R (R_CTRL) e células HCT116-R tratadas com TFD+L-OHP+CURC (R_Tripla) estão descritos na Tabela 3.

Apenas duas amostras de cada grupo foram destinadas para o RNAseq, conforme cumprimento dos critérios de concentração total de RNA e qualidade/pureza exigidos pela empresa prestadora do serviço. As demais amostras foram armazenadas em freezer -80 para uso posterior na análise de validação por RT-qPCR.

Tabela 3 - Caracterização do RNA total. (*) Qualidade e pureza analisadas diretamente pela empresa responsável pelo sequenciamento (RNAseq). (#) Amostras enviadas para o RNAseq. (NA) Sem análise de qualidade e pureza, visto que a amostra não foi destinada para uso no RNAseq. (E1) Eluição 1. (E2) Eluição 2.

| | ID da amostra | Concentração total de RNA seco (mg) – Qubit | Qualidade e pureza – Bioanalyzer |
|-----------------|----------------------|--|---|
| S_CTRL | A1# | 1,4 | 10 |
| | A2 | 1,7 | 10 |
| | A3 # | 2,4 | >6,4* |
| | A4 E1 | 2,0 | NA |
| | A4 E2 | 8,3 | NA |
| R_CTRL | A1# | 1,9 | 10 |
| | A2 | 1,8 | 10 |
| | A3 E1 # | 3,7 | >6,4* |
| | A3 E2 # | 7,4 | NA |
| | A4 E1 | 6,9 | NA |
| R_Tripla | A4 E2 | 7,4 | NA |
| | A1# | 2,2 | 10 |
| | A2# | 1,7 | 7,4 |
| | A3 | 9,4 | NA |
| | A4 | 4,9 | NA |

4.3.7.2. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA POR RNAseq

A análise de agrupamento das amostras por calor (Heatmap) com a visão geral das semelhanças e diferenças entre as duplicatas das amostras S_CTRL, R_CTRL e R_Tripla utilizadas no sequenciamento está representada na Figura 27. É possível observar uma maior similaridade entre as duplicatas de uma mesma amostra, maior similaridade entre as amostras

R_Tripla e R_CTRL, seguido de maior similaridade entre a R_CTRL e S_CTRL, e menor similaridade entre R_Tripla e S_CTRL.

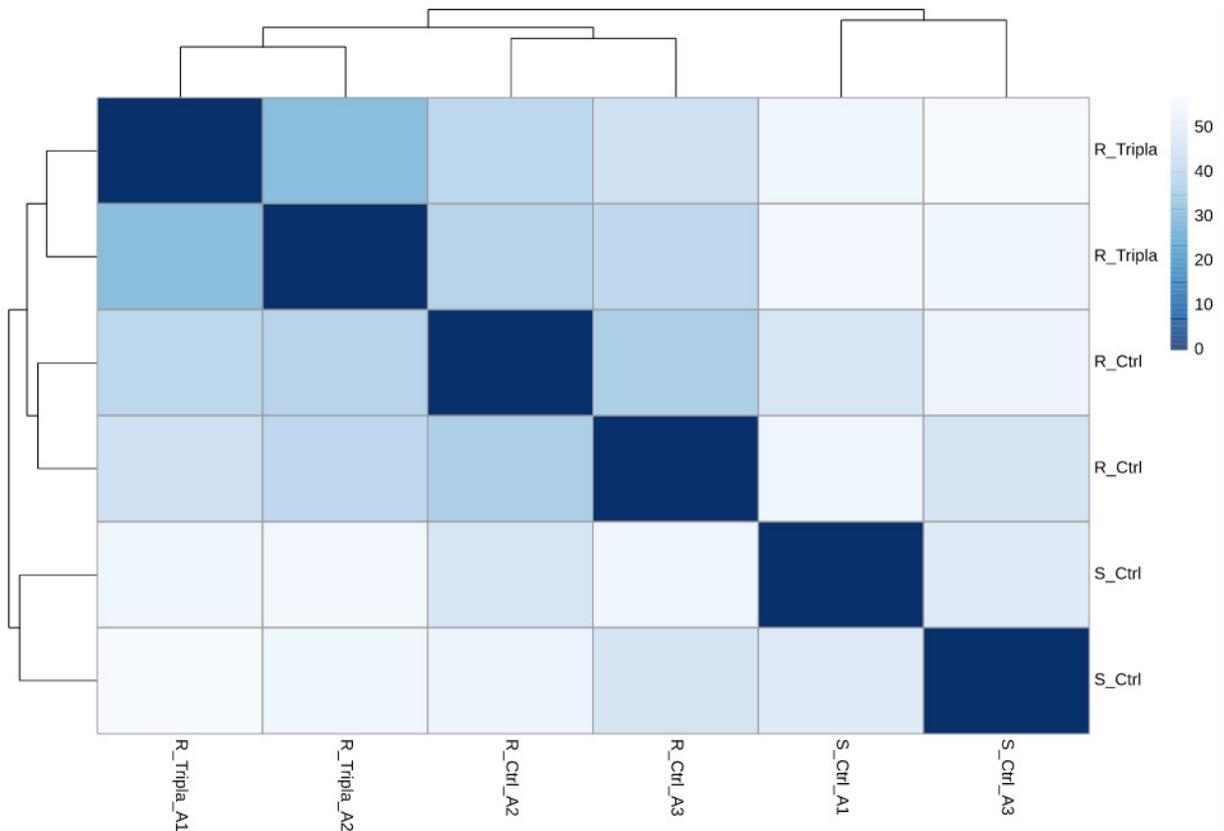


Figura 27 - Heatmap evidenciando as semelhanças e diferenças entre as duplicatas das amostras S_CTRL, R_CTRL e R_Tripla utilizadas na análise de RNAseq.

As análises dos DEGs obtidos nos comparativos “R_CTRL x S_CTRL”, “R_Tripla x R_CTRL” e “R_Tripla x S_CTRL” estão representados na Figura 28, onde estão evidenciados alguns dos genes com alteração significativa ($p < 0.05$) e expressão UP ($\log_2FC \geq 1$) ou DOWN ($\log_2FC \leq -1$) no nível de mRNA dentre as 22.684 variáveis analisadas.

Em relação aos outros comparativos, para o grupo “R_Tripla x R_CTRL” é possível observar uma menor quantidade de DEGs.

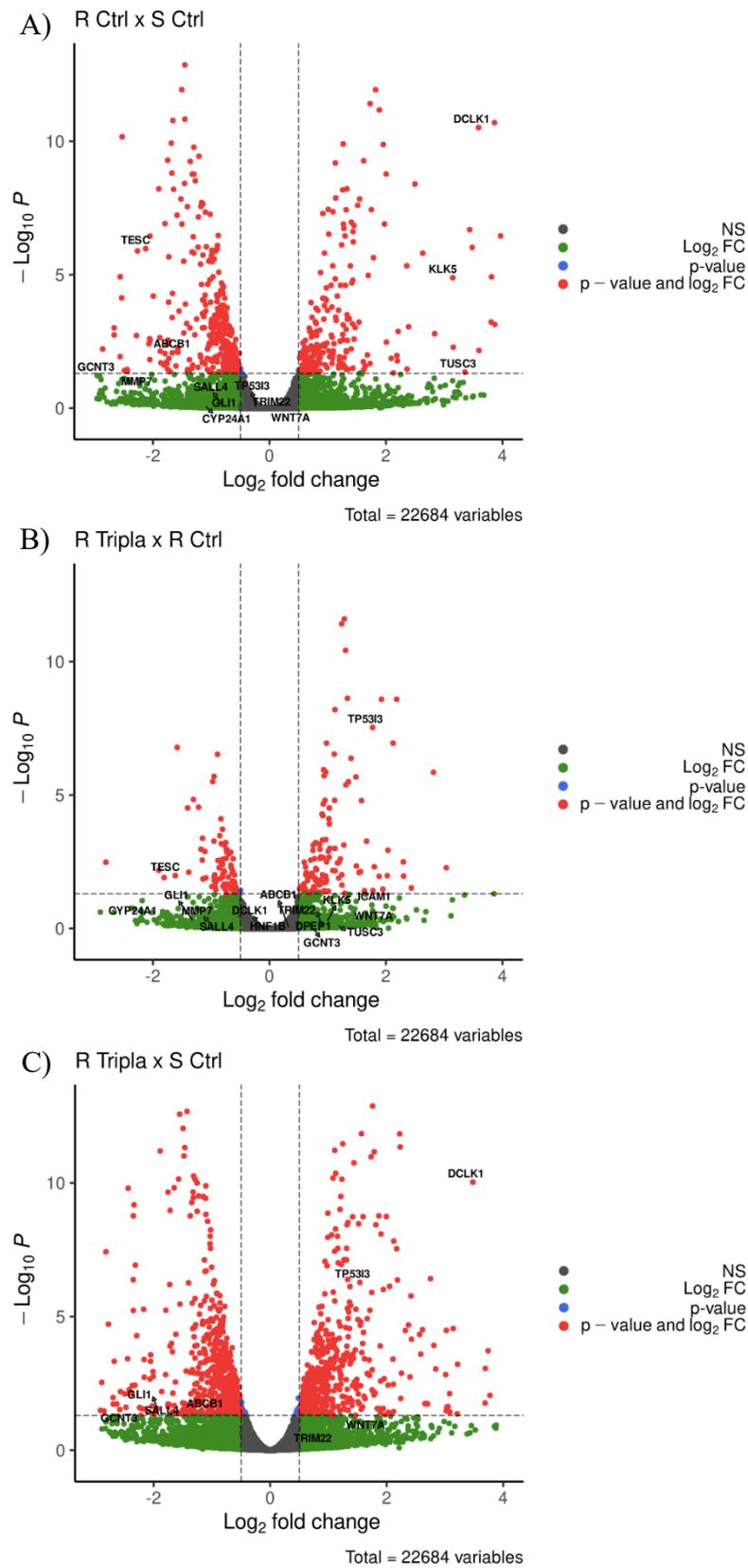


Figura 28 – Volcano plot dos DEGs obtidos por meio da análise do transcriptoma por RNAseq. (A) Comparativo R_CTRL x S_CTRL. (B) Comparativo R_Tripla x R_CTRL. (C) Comparativo R_Tripla x S_CTRL. P-value<0,05. Log2FC ≥1 (UP) ou log2FC ≤-1 (DOWN).

Adicionalmente, na Figura 29, está representado o diagrama de Venn para os DEGs, considerados mais significativos ($\log_2FC \leq -1$ e ≥ 1 , P-value $< 0,05$), de forma a restringir mais a seleção e obter os genes comuns e exclusivos para os diferentes comparativos.

Dessa maneira, obteve-se um total de 599 DEGs, onde: 72 DEGs foram exclusivos para a comparação “R_CTRL x S_CTRL”, 253 DEGs exclusivos para “R_Tripla x S_CTRL” e 25 DEGs exclusivos para “R_Tripla x R_CTRL”. Além desses, foram encontrados apenas 5 DEGs em comum aos três comparativos, seguido de 7 DEGs em comum entre “R_Tripla x S_CTRL” e “R_CTRL x S_CTRL”, 207 DEGs quando comparado “R_CTRL x S_CTRL” e “R_Tripla x S_CTRL”, e 30 DEGs na intersecção entre “R_Tripla x S_CTRL” e “R_Tripla x R_CTRL”.



Figura 29 - Diagrama de Venn dos DEGs mais significativos ($\log_2FC \leq -1$ e ≥ 1 , P-value $< 0,05$) evidenciando os genes comuns e exclusivos para os diferentes comparativos realizados.

Por fim, na Figura 30, está representado o enriquecimento de termos com base no sistema de classificação GO, destacando as principais vias/processos nos quais os DEGs estão envolvidos. Afim de facilitar a interpretação dos dados e evidenciar os principais pontos nos quais as vias e processos encontrados estão envolvidos, foi realizada uma subdivisão em cinco grupos, sendo: (1) Resposta imune (do inglês, *immune response*); (2) Metabolismo celular (do inglês, *cellular metabolism*); (3) Transcrição e regulação da expressão gênica (do inglês,

transcription and regulation of gene expression); (4) Adesão, migração, sinalização e morte celular (do inglês, *adhesion, migration, signaling and cell death*); e (5) Resposta a estímulo químico (do inglês, *responde to chemical stimuli*).

Quando comparada a S_CTRL, pode-se observar que a célula R_CTRL apresentou uma tendência de redução da expressão de genes envolvidos em vias relacionadas a transcrição e regulação da expressão genica, entretanto, quando tratada (R_Tripla), observou-se um aumento da expressão dos genes envolvidos no processo de regulação gênica, também foram observadas mudanças na expressão de genes envolvidos em diversas outras vias evidenciadas na Figura 30. Já a célula R_Tripla comparada ao R_CTRL, houve uma redução da expressão de genes envolvidos com metabolismo celular e funções moleculares, bem como aumento de genes relacionados a transportadores transmembranares.

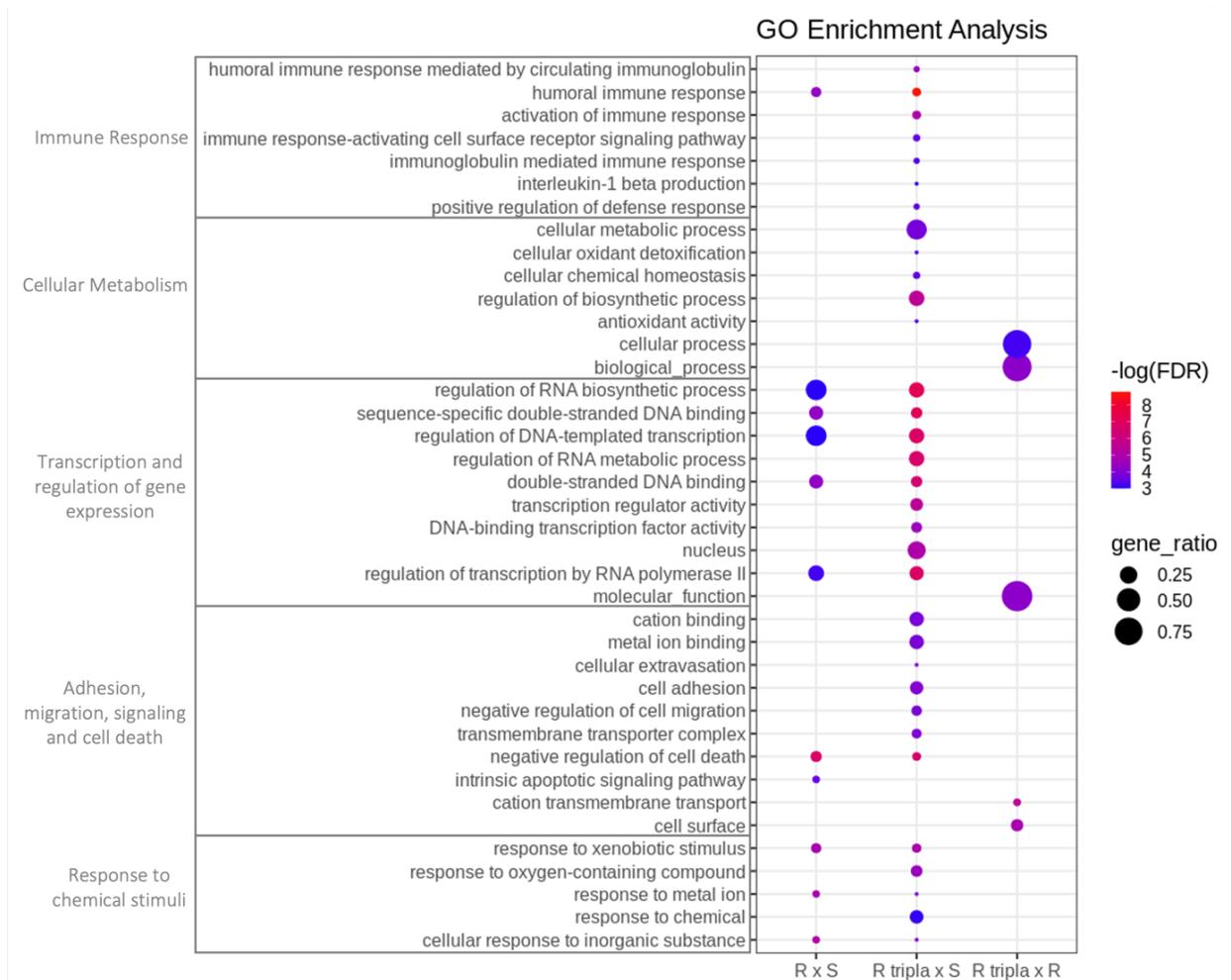


Figura 30 - Enriquecimento de processos biológicos com base na análise de Gene Ontology (GO) a fim de entender as vias nas quais os DEGs estão envolvidos. O tamanho da razão do gene (*gene_ratio*) foi calculado com base na razão dos DEGs que estão contidos no termo pelo total de DEGs. A escala por coloração $-\log(\text{FDR})$ representa a regulação dos transcritos UP (vermelho) e DOWN (azul).

4.3.7.2.1. ANÁLISE DOS DEGs PARA ESCOLHA DE GENES CANDIDATOS PARA VALIDAÇÃO POSTERIOR POR RT-qPCR

Considerando as 22.684 variáveis encontradas por meio do RNAseq, foram selecionados os DEGs com expressão significativa ($p < 0.05$) UP ($\log_2FC \geq 1$) ou DOWN ($\log_2FC \leq -1$) com base na sua função descrita na literatura, considerando o contexto aqui utilizado.

Sendo assim, na Tabela 4, estão descritos os 20 genes (ABCB1, BAX, CDKN1A, CYP24A1, DCLK1, DPEP1, FOXA2, GCNT3, GRHL3, HNF1B, ICAM1, KLK5, MMP7, PRUNE2, SLC12A5, STEAP4, TESC, TP53I3, TUSC3 e WNT7A) escolhidos para validação futura por meio da técnica de RT-qPCR, bem como a função geral de cada gene e a referência bibliográfica que embasou a sua escolha.

Tabela 4 - Genes candidatos para validação posterior por RT-qPCR.

| Gene Symbol | Nome do gene | R_CTRL x S_CTRL | | R_Tripla x R_CTRL | | R_Tripla x S_CTRL | | Função Geral | Referências |
|-------------|--|-----------------|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|--|--|
| | | log2FC | p-value | log2FC | p-value | log2FC | p-value | | |
| ABCB1 | ATP binding cassette subfamily B member 1 | -1,57 | 1,77E-04 | 0,33 | 4,39E-01 | -1,24 | 2,57E-03 | Promotor de P-gp (MDR1), bomba de efluxo dependente de ATP localizada na membrana celular. Baixa expressão em tumores pouco diferenciados e alta expressão em células bem diferenciadas. Papel crucial no perfil MDR, relacionado ao efluxo de fármacos. | (BADIC <i>et al.</i> , 2020; EL KHOURY <i>et al.</i> , 2016) |
| BAX | BCL2 associated X, apoptosis regulator | 0,76 | 1,49E-04 | 0,81 | 3,80E-05 | 1,57 | 2,80E-15 | Pro-apoptótico. Expressão de BAX é induzida pela ação de p53. Correlacionado como mediador importante para a ação provocada por p53 durante a apoptose. | (MANOOCHEHRI <i>et al.</i> , 2014; PRYCZYNICZ <i>et al.</i> , 2014; YANG <i>et al.</i> , 2011; ZARGHAMPOOR; VALIBEIGI; BEHZAD-BEHBAHANI, 2023) |
| CDKN1A | cyclin dependent kinase inhibitor 1A | -0,79 | 2,20E-07 | 1,91 | 2,25E-36 | 1,12 | 1,16E-13 | Conhecida como p21. Regulação da progressão do ciclo celular no estágio G1. A associada a assinatura mesenquimal (CMS4) em CRC. | (BUENO-FORTES <i>et al.</i> , 2022; ZHU <i>et al.</i> , 2019) |
| CYP24A1 | cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 | -1,1 | 2,64E-01 | -2,2 | 2,55E-02 | -3,29 | 8,08E-04 | Oncogene. Relacionado a distúrbios metabólicos específicos da vitamina D no organismo, associado a promoção da tumorigênese através da via WNT. | (CHAI <i>et al.</i> , 2021; HORVÁTH <i>et al.</i> , 2010; SUN; LI; LIU, 2016) |

| | | | | | | | | Inibição do crescimento celular e indução da diferenciação celular e/ou apoptose. | |
|-------|--|-------|----------|-------|----------|-------|----------|---|---|
| DCLK1 | doublecortin like kinase 1 | 3,59 | 4,92E-14 | -0,11 | 7,81E-01 | 3,48 | 2,79E-13 | Oncogene. Correlacionado com recorrência tumoral e metástase, e tumores resistentes à quimioterapia. | (GZIL <i>et al.</i> , 2019; MAKINO <i>et al.</i> , 2020; MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2021; WANG <i>et al.</i> , 2022) |
| DPEP1 | dipeptidase 1 | -10,2 | 2,55E-12 | 0,83 | 6,39E-01 | -9,36 | 1,82E-18 | Oncogene. Promove proliferação celular, metástase e invasão. | (LAI <i>et al.</i> , 2020; ZENG <i>et al.</i> , 2023a) |
| FOXA2 | forkhead box A2 | -3,58 | 1,79E-02 | -3,56 | 8,67E-02 | -7,14 | 2,62E-04 | Oncogene. Ação na proliferação, migração e invasão, e transição epitelial mesenquimal. | (WANG <i>et al.</i> , 2018; ZENG <i>et al.</i> , 2023b) |
| GCNT3 | glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin typ | -2,96 | 2,22E-03 | 0,74 | 4,62E-01 | -2,21 | 1,49E-02 | Supressor de tumor. Relacionado ao ciclo celular, mitose e proliferação, resposta a drogas e vias metabólicas. Expressão leva ao ganho de propriedades celulares anticancer, redução do crescimento celular, a invasão e alteração das capacidades metabólicas. | (FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2018; GONZÁLEZ-VALLINAS <i>et al.</i> , 2014, 2015) |
| GRHL3 | grainyhead like transcription factor 3 | 8,58 | 4,20E-09 | 3,17 | 8,88E-02 | -2,46 | 4,31E-02 | Oncogene. Promove o crescimento tumoral e metástase através da via MEK em CRC. Envolvido na formação da barreira epidérmica, fechamento do tubo neural e reparo de feridas/cicatrização. | (TAN <i>et al.</i> , 2021; WANG <i>et al.</i> , 2017) |
| HNF1B | HNF1 homeobox B | -8,33 | 6,31E-07 | 0 | 1,00E+00 | -8,5 | 3,73E-07 | Supressor de tumor. Expressão associada ao comportamento benigno ou maligno | (BÁRTŮ <i>et al.</i> , 2020; JEONG <i>et al.</i> , 2020) |

| | | | | | | | | | |
|---------|-----------------------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|---|---|
| | | | | | | | | de lesões. Mecanismo específico ainda desconhecido. | |
| ICAM1 | intercellular adhesion molecule 1 | -6,4 | 9,36E-32 | 1,76 | 2,75E-03 | -4,64 | 2,47E-31 | Promotor de tumor. Membro da superfamília de imunoglobulinas. Aumento da adesão de células tumorais ao endotélio e células sanguíneas circulantes e, conseqüentemente, metástase e angiogênese. Redução da resposta imune. Relacionado positivamente a expressão de P-gp. | (LIM <i>et al.</i> , 2022; LIU; LIU; XIN, 2017; YILMAZ <i>et al.</i> , 2021) |
| KLK5 | kallikrein related peptidase 5 | 3,15 | 9,53E-08 | 0,99 | 4,37E-02 | 4,14 | 1,39E-12 | Oncogene. Potencial biomarcador de prognóstico desfavorável para CRC. | (PAPACHRISTO POULOU <i>et al.</i> , 2019; WU <i>et al.</i> , 2016) |
| MMP7 | matrix metalloproteinase 7 | -2,13 | 1,13E-02 | -0,95 | 3,04E-01 | -3,09 | 4,82E-04 | Oncogene. Relacionado a via de sinalização de WNT. Papel na carcinogênese, invasão ou recorrência. | (CHEN; KE, 2021; LEUNG <i>et al.</i> , 2022; ZHU <i>et al.</i> , 2019) |
| PRUNE2 | prune homolog 2 with BCH domain | -6,39 | 3,11E-03 | 1,28 | 6,21E-01 | -5,12 | 1,79E-02 | Supressor de tumor. Expressão está associada a redução da sobrevivência celular, proliferação, invasão e promoção da apoptose. | (LI <i>et al.</i> , 2022a, 2022b) |
| SLC12A5 | Solute carrier family 12 member 5 | -4,61 | 4,32E-05 | -3,61 | 4,78E-02 | -8,22 | 1,03E-06 | Oncogene. Associado a progressão tumoral e metástase. Biomarcador de prognóstico desfavorável para CRC. Biomarcador imunológico para tumores. | (GOPANENKO <i>et al.</i> , 2020; JIANG; LIAO; CHEN, 2021; XU <i>et al.</i> , 2016; YU <i>et al.</i> , 2014) |

| | | | | | | | | | |
|--------|---|-------|----------|-------|----------|-------|----------|--|---|
| STEAP4 | STEAP4 metalloredutase | -5,11 | 1,37E-02 | -1,6 | 5,25E-01 | -6,71 | 1,30E-03 | Oncogene. Regulado de maneira dependente da hipóxia, levando a uma desregulação no equilíbrio do ferro mitocondrial e promoção tumoral. Regulador da absorção de cobre celular mediada por inflamação. | (LIAO <i>et al.</i> , 2020; XUE <i>et al.</i> , 2017) |
| TESC | Tescalcin | -2,13 | 5,87E-09 | -1,62 | 7,76E-05 | -3,74 | 3,43E-21 | Oncogene. Relacionado a invasão e metástase. O knockdown de TESC inibiu a via NF-κB dependente de Akt e diminuiu a sobrevivência celular in vitro. | (BUSUIOC <i>et al.</i> , 2022; HEE KANG <i>et al.</i> , 2014; KANG <i>et al.</i> , 2016) |
| TP53I3 | tumor protein p53 inducible protein 3 | -0,23 | 3,93E-01 | 1,77 | 1,69E-11 | 1,54 | 3,74E-09 | Supressor de tumor. Papel na parada do ciclo celular e apoptose. Ativado transcricionalmente por p53, sugere-se que desempenha um papel na resposta ao dano do DNA e na apoptose induzida por espécies reativas de oxigênio | (CHAUDHRY <i>et al.</i> , 2021; CHAUVIN <i>et al.</i> , 2022; CHEN; ZHANG; XU, 2021) |
| TUSC3 | tumor suppressor candidate 3 | 3,36 | 1,53E-03 | 1,18 | 1,30E-01 | 4,54 | 1,38E-05 | Oncogene. Associado a indução da resistência a drogas, capacidade stemness progressão do CRC, e a transição epitelial-mesenquimal (EMT) através da sinalização WNT/β-catenina e MAPK. Superexpressão associada ao estágio T, metástase em linfonodos e metástase distante. | (GU <i>et al.</i> , 2016; REN <i>et al.</i> , 2020; ZHU; DONG, 2018) |
| WNT7A | wingless-type MMTV integration site family, member 7A | -0,07 | 9,37E-01 | 1,79 | 3,21E-02 | 1,72 | 3,87E-02 | Oncogene. Sinalização Wnt/β-catenina, a qual está associada a quimioresistência e escape do sistema imune. | (HSIEH <i>et al.</i> , 2023; KIRIKOSHI; KATO, 2002; LI <i>et al.</i> , 2021; NIE <i>et al.</i> , 2020; ZHU; LI, 2023) |

A análise de enriquecimento do conjunto dos 20 genes candidatos realizada por meio da plataforma Enrich R permitiu evidenciar os 10 principais termos relacionados aos genes listados, com valor de significância $<0,05$ (p-value e adjusted p-value/q-value), conforme Tabela 5. Alguns dos termos listados estão relacionados a atividade de p53, resposta a dano celular, vias relacionadas ao desenvolvimento de câncer, e a indução de sinal de sobrevivência induzido por TFD.

Tabela 5 – Lista dos dez principais termos relacionados aos genes diferencialmente expressos analisados por meio plataforma Enrich R.

| Termos | p-value | q-value | Sobreposição dos genes |
|--|----------|----------|----------------------------------|
| p53 transcriptional gene network WP4963 | 5,35E-01 | 7,10E-05 | [CDKN1A, TP53I3, BAX, ICAM1] |
| LncRNA-mediated mechanisms of therapeutic resistance WP3672 | 1,42E+01 | 9,38E-04 | [CDKN1A, ABCB1] |
| Vitamin D Receptor Pathway WP2877 | 2,87E+01 | 1,26E-03 | [CDKN1A, ABCB1, STEAP4, CYP24A1] |
| TP53 network WP1742 | 1,61E+02 | 4,55E-03 | [CDKN1A, BAX] |
| DNA damage response (only ATM dependent) WP710 | 1,72E+02 | 4,55E-03 | [CDKN1A, WNT7A, BAX] |
| FGF23 signaling in hypophosphatemic rickets and related disorders WP4790 | 2,17E+02 | 4,77E-03 | [CDKN1A, CYP24A1] |
| Breast cancer pathway WP4262 | 4,64E+02 | 8,12E-03 | [CDKN1A, WNT7A, BAX] |
| Nuclear Receptors in Lipid Metabolism and Toxicity WP299 | 4,92E+02 | 8,12E-03 | [ABCB1, CYP24A1] |
| Integrated Cancer Pathway WP1971 | 8,76E+02 | 1,29E-02 | [CDKN1A, BAX] |
| Photodynamic therapy-induced AP-1 survival signaling. WP3611 | 1,13E+03 | 1,49E-02 | [CDKN1A, BAX] |

Por fim, na Figura 31 está representada a análise de enriquecimento de estado ou processo biológico por meio da base de dados de assinaturas moleculares (do inglês: *Molecular Signatures Database* – MSigDB) da plataforma Enrich R.



Figura 31 - Análise de enriquecimento representando um estado ou processo biológico definido para os genes diferencialmente expressos. Gráfico adaptado da plataforma Enrich R.

5. DISCUSSÃO

A quimioterapia é sem dúvidas um grande aliado no tratamento de CRC, principalmente quando falamos de CRC avançado ou metastático. Apesar disso, conforme descrito por BRAUN & SEYMOUR (2011), os tratamentos para tumores mais agressivos têm sido insuficientes no que se refere a toxicidade para o paciente e que, por consequência, causam efeitos adversos, reduzindo a qualidade de vida. Em seu trabalho, esses autores trazem a problemática de que o objetivo dos tratamentos, bem como a justificativa para sua escolha, seja no cenário adjuvante, neoadjuvante ou paliativo, não deve ser apenas a eficácia, mas devem ser pautados no propósito de tentar maximizar a qualidade de vida e longevidade dos pacientes.

Como já mencionado no capítulo introdutório desse trabalho, essa perspectiva também foi exposta por ZHANG *et al.* (2016), onde se estabelece duas características principais para definir um fármaco/tratamento como útil, sendo: alta eficácia e baixa toxicidade.

Quando falamos de quimioterapia com L-OHP, é importante mencionar a toxicidade associada a esse quimioterápico, que causa ao paciente reações adversas, como a neurotoxicidade por meio hiperexcitabilidade dos nervos periféricos, causando sintomas como: espasmos musculares, dificuldade em respirar ou engolir, dor neuropática, neurotoxicidade sensorial cumulativa crônica levando a parestesias (dormência) e/ou disestesias (formigamento) nas mãos, pés e boca, fraqueza e alterações no equilíbrio, alterações visuais, entre outros (CAPONERO; MONTARROYOS; TAHAMTANI, 2016; COMELLA *et al.*, 2009; GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018; KOBUCHI; SHIMIZU; ITO, 2020; LEONARD *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2002).

O surgimento desses sintomas muitas vezes leva a necessidade de reduzir a dose do tratamento, o que pode levar a perda de eficácia, ou mesmo necessidade de descontinuar o tratamento, visto que causa debilidades ao paciente (LEONARD *et al.*, 2005). É sabidamente conhecido que ao reduzir a dose do tratamento há um risco aumentado de que algumas células tumorais desenvolvam mecanismos de resistência a esse fármaco (CEBALLOS *et al.*, 2019; MARTIN; HAMILTON; SCHILDER, 2008). Dessa forma é justificada a necessidade de tratamentos combinatórios que possam potencializar a eficácia da quimioterapia, ao mesmo tempo que reduz o tempo de exposição ao tratamento (BRAUN; SEYMOUR, 2011).

Os pontos mencionados não reduzem e nem mesmo descredibilizam a utilização da L-OHP, sabidamente importante para tratamento de CRC avançado ou metastático, mas trazem a perspectiva de atenção para que os médicos possam refletir sobre as escolhas terapêuticas corretas, bem como motivam o desenvolvimento de novas terapias ou estratégias que possam

potencializar o efeito da L-OHP, ao mesmo tempo que mitigar os desafios decorrentes da utilização desse quimioterápico (BRAUN; SEYMOUR, 2011; KOBUCHI; SHIMIZU; ITO, 2020).

Nessa perspectiva, devido a necessidade de utilizar um modelo *in vitro* de resistência a quimioterapia com L-OHP visando avaliar novas abordagens terapêuticas, bem com entender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos, aliado a indisponibilidade de um modelo comercial, foi necessário estabelecer o modelo apresentado aqui.

O protocolo de exposição prolongada e aumento gradual da concentração de L-OHP é viável e nos permitiu obter com sucesso uma linhagem celular significativamente resistente à L-OHP, confirmada pelo aumento no valor do IC₅₀, o qual foi 10 vezes maior para a linhagem HCT116-R do que para linhagem HCT116-S. O tempo de 11 meses para obtenção das células HCT116-R com índice de resistência igual a 10,2±1,0 foi semelhante ao relatado por ZHANG *et al.* (2018), os quais levaram aproximadamente 9,4 meses e índice de resistência de 10,78 para a linhagem HCT-8 resistente a L-OHP.

As células utilizadas aqui foram cultivadas por 40 passagens até atingirem o valor de resistência final, o que corrobora com os dados apresentados no trabalho de JENSEN *et al.* (2015), no qual as três linhagens celulares de CRC utilizadas (HCT116; HT29; LoVo) estavam entre as passagens 41 e 47 na última exposição a L-OHP. Portanto, entende-se que esse é um número de passagens médio para que se obtenha sucesso na resistência envolvendo exposição prolongada e gradual à L-OHP.

Foi mostrado aqui que a linhagem celular HCT116-R (tempo de duplicação: 26,89±0,8 horas) tem uma taxa de crescimento mais lenta em comparação com a linhagem celular HCT116-S (tempo de duplicação: 19,29±0,9 h). A taxa de crescimento mais lenta, quando comparada à linhagem parental após a aquisição da resistência à L-OHP, também foi relatada por EL KHOURY *et al.* (2016). Adicionalmente, esses autores também observaram uma mudança semelhante na taxa de crescimento de células HCT116 resistentes à DOX em comparação com as células parentais.

Semelhante aos dados apresentados aqui, LIU *et al.* (2010) desenvolveram duas linhagens celulares de CRC resistentes a L-OHP (SW620/L-OHP e loVo/L-OHP) após uma exposição prolongada e aumento gradual da concentração de L-OHP, totalizando 10 meses e mais de 100 passagens para obter as linhagens celulares finais. Corroborando com nossos resultados, os autores também evidenciaram que o tempo de duplicação das células resistentes

(SW620/L-OHP: 34,94 horas; loVo/L-OHP: 28,11 horas) se tornou um pouco mais lento quando comparado com as células sensíveis (SW620: 29,53 horas; loVo: 24,77 horas).

O sucesso no estabelecimento da linhagem foi mais uma vez confirmado por meio do ensaio de formação de esferas tumorais, onde pode-se observar que as células HCT116-R não tiveram a formação dos seus esferoides afetada quando expostas até mesmo a concentrações mais elevadas de L-OHP, ao contrário do observado para as células HCT116-S, assim como apresentaram esferoides mais bem definidos/delimitados. Em seu trabalho, EL KHOURY *et al.* (2016), observaram que tanto a linhagem HCT116 resistentes à DOX quanto a linhagem HT-19 resistente a L-OHP foram mais eficazes em formar esferoides em quantidade e em tamanho do que as linhagens parentais/sensíveis. Esses autores associaram essa observação a uma característica conhecida das CSC, comuns em tumores resistentes.

Os dados de RTCA para caracterização do crescimento celular corroboraram com as observações anteriores quanto a diferença existente na curva de crescimento de cada linhagem celular. As células HCT116-S crescem a uma taxa mais rápida e morrem após um período de exposição a qualquer concentração de L-OHP. Em contraste, as células HCT116-R crescem mais lentamente quando expostas a concentrações mais baixas de L-OHP, enquanto nas concentrações mais altas, as células resistentes parecem entrar em um estado estacionário ou uma espécie de senescência, muito relacionada na literatura como uma forma de proteção de células tumorais à ação de fármacos que causam danos ao DNA e, por consequência, pode estar relacionada a reincidência de tumores (CHANG *et al.*, 1999; WAS *et al.*, 2017, 2018).

Apesar de WAS *et al.* (2017) terem encontrado indução de senescência para células HCT116 tratadas com CPT-1 e DOX, no trabalho deles não foi detectado a indução de senescência por L-OHP. Entretanto, um ponto importante a ser mencionado é que em seu trabalho os autores utilizaram a concentração mais baixa de L-OHP (5 μ M) e a linhagem HCT116 parental, enquanto no atual estudo observamos a pausa do crescimento na linhagem HCT116-R cultivada na presença de L-OHP à 50 e 100 μ M. Em sua conclusão, WAS *et al.* (2017) sugerem que as células tumorais senescentes que aparecem durante a terapia poderiam ser consideradas células “dormentes”, as quais vão contribuir para uma reincidência do tumor, quando a quimioterapia é finalizada/suspensa.

Corroborando com o encontrado aqui, ALMENDRO *et al.* (2009) desenvolveram três linhagens resistentes a L-OHP (RHT29, RHCT116 p53(+/+), RHCT116 p53(-/-)) e demonstraram que as linhagens modificadas eram mais resistentes à apoptose quando expostas à quimioterapia do que as linhagens parentais. Nossos resultados sugerem que as células

HCT116-R também estão evadindo a apoptose, mesmo quando expostas a concentrações mais altas de L-OHP. Por outro lado, as células HCT116-S expostas a maiores concentrações de L-OHP demonstraram uma alta taxa de apoptose e uma maior porcentagem da fase sub-G1.

A análise do ciclo celular indicou um percentual aumentado de células HCT116-R na fase G0/G1, diferente das células HCT116-S. Vale ressaltar que as células param de crescer na fase G0 e iniciam o ciclo celular na fase G1, portanto o aumento dessa proporção de células corresponde à parada do crescimento celular (FENG; DONG, 2015; LIU *et al.*, 2010; MONTOPOLI *et al.*, 2009; SU *et al.*, 2021).

Conforme demonstrado aqui, a proporção de células HCT116-R na fase G2/M aumentou após exposição a L-OHP 100 μ M, quando comparada com as outras concentrações. Nesse sentido, é importante notar que a fase G2/M é conhecidamente um checkpoint de danos ao DNA, o qual permite que as células reparem o DNA danificado, mantendo a estabilidade genômica, ou parem a proliferação. Essa fase é comumente aumentada em células tratadas com drogas à base de platina, associada à apoptose (ATALLAH *et al.*, 2004; SZAKÁCS *et al.*, 2006). Esse resultado já era esperado, visto que as células HCT116-R estabelecidas aqui são resistentes à apenas 10x o valor de IC₅₀.

SU *et al.* (2021) demonstraram que a linhagem resistente a HCT116/L-OHP (DRI 9.4) desenvolvida era composta principalmente pela maior proporção de células na fase G1, o que diminuiu após tratamento combinado com L-OHP e erianina, ao mesmo tempo em que houve um aumento significativo da proporção de células na fase G2/M, indicando uma reversão da resistência L-OHP. Além disso, YANO *et al.* (2014) demonstraram que as células tumorais invasivas geralmente estavam na fase G0/G1, associadas a um perfil resistente à quimioterapia e possuíam uma capacidade migratória mais acelerada do que as células tumorais na fase S/G2/M.

Semelhante ao observado aqui, LIU *et al.* (2010) obtiveram uma maior proporção de células na fase G0/G1 e menor proporção na fase G2/M para suas linhagens celulares resistentes a L-OHP (SW620/L-OHP e loVo/L-OHP) quando comparado com a linha celular parental, uma descoberta que os autores associaram ao desenvolvimento de um fenótipo semelhante a CSC e um perfil MDR.

Sabe-se que células resistentes a quimioterápicos podem desenvolver diversos mecanismos de MDR, como inativação de drogas, alterações nos sítios-alvo das drogas, aumento do reparo do DNA, aumento da expressão de genes relacionados à resistência,

alterações no ciclo celular, alta expressão de bombas de efluxo de drogas e inibição de morte celular por supressão da apoptose (YANO *et al.*, 2014).

Dessa forma, podemos inferir que a evasão da apoptose, após o tratamento com L-OHP para as células HCT116-R, observada em nosso trabalho está relacionada à aquisição de resistência à L-OHP por algum dos mecanismos descritos na literatura: aumento das proteínas de reparo do DNA removendo os adutos de platina-DNA, modulação de proteínas reguladoras do ciclo celular ou mesmo maior tolerância ao acúmulo de adutos de DNA (ATALLAH *et al.*, 2004; FENG; DONG, 2015; HOWELLS *et al.*, 2011; MANSOORI *et al.*, 2017). Nesse sentido, até aqui, foi constatado o sucesso na aquisição da linhagem HCT116-R.

A avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos combinatórios utilizados aqui, demonstrou que apesar da linhagem HCT116-R ser significativamente resistente ao quimioterápico, quando expostas aos tratamentos alternativos de forma isolada (CURC, NLSC e TFD), não foi encontrada diferença significativa na ação desses fármacos sobre as células sensíveis e resistentes. Ou seja, o valor de IC₅₀ desses fármacos é estatisticamente semelhante para ambas as linhagens.

A única diferença encontrada aqui foi na comparação entre o valor de IC₅₀ da CURC e da NLSC para as células HCT116-R, sendo a curcumina em sua forma livre mais citotóxica para esta linhagem. Isso pode ser explicado pelo simples fato de que a exposição direta ao fármaco nas condições controladas de cultivo de células *in vitro* é mais eficiente do que a utilização em sua forma nanoestruturada. Entretanto, estudos futuros que busquem investigar a ação da curcumina *in vivo* devem utilizar a sua forma nanoestruturada, objetivando aumentar a biodisponibilidade, conforme já demonstrado na literatura (IDOUDI *et al.*, 2022; OJO *et al.*, 2022; PENG *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2019). Cabe ressaltar que para a AICIFt, devido a sua alta hidrofobicidade, foi indispensável o uso da sua forma nanoestruturada (NE-AICIFt), como já demonstrado anteriormente por MUEHLMANN *et al.* (2015).

Os valores obtidos de IC₅₀ para a NLS foram estatisticamente diferentes do obtido para a NLSC em ambas as linhagens. Sendo a significância maior para HCT116-R do que para HCT116-S, o que pode estar associado à própria característica de resistência trabalhada aqui.

Apesar da diferença estatística mencionada, foi considerado inviável o uso dessa nanopartícula em concentrações mais elevadas, conforme demonstrado no ensaio de sinergismo, o qual utilizou valores de NLSC 2x(IC₅₀) e 4x(IC₅₀) e resultou em uma alta toxicidade, independente do uso individual ou combinado e do tipo de linhagem. Os dados observados para essas concentrações podem ser o efeito tóxico dos próprios componentes da nanopartícula para

a nossa linhagem. Portanto, no geral, não foi encontrada vantagem no uso da NLSC em comparação com a curcumina livre na redução da concentração inibitória em nosso modelo *in vitro*.

A combinação terapêutica utilizada aqui foi escolhida baseada na ideia das duas principais características de um fármaco/tratamento útil: alta eficácia e baixa toxicidade (ZHANG; FU; CHOU, 2016). Sendo justificada a utilização da TFD como pré-sensibilizante por meio de NE contendo o fotossensibilizante AICIFt, L-OHP com concentração estimada na metade do seu valor de IC₅₀ combinada com a CURC.

Os resultados observados para os ensaios de viabilidade e clonogênico corroboraram entre si para HCT116-S quando exposta a L-OHP ou tratamentos combinatórios, visto que na presença de L-OHP com ou sem as demais combinações apontaram para uma redução da viabilidade celular e capacidade de formar colônias, como esperado.

Já para a linhagem resistente, os tratamentos combinatórios (L-OHP+CURC, TFD+L-OHP, TFD+CURC e TFD+L-OHP+CURC) demonstram uma capacidade de potencializar o efeito da L-OHP, sem necessidade de utilização de uma alta concentração da quimioterapia para eficácia terapêutica, diferente do observado para os tratamentos de forma isolada (monomodal).

O ensaio de migração - scratch assay corroborou com o observado nos ensaios de caracterização da linhagem, onde foi constatado que a linhagem HCT116-S tem uma taxa de duplicação e/ou crescimento mais acelerada do que a linhagem HCT116-R. Para a linhagem HCT116-R podemos inferir que o impacto dos tratamentos parece não ser tão efetivo na redução da migração celular. Porém, há um indicativo de um potencial mais efetivo do grupo TFD+CURC+L-OHP no que se refere a redução da migração celular quando comparada ao grupo controle, o que não foi observado para os demais grupos.

Para o ensaio de migração em tempo real, foi possível observar que para o grupo controle e sem L-OHP a linhagem HCT116-S apresentou maior taxa de migração ao final das 48 horas. Enquanto os grupos expostos à L-OHP apresentaram valores negativos para HCT116-S, corroboraram com o esperado e demonstrado até aqui, e indicando um papel importante da L-OHP no perfil migratório dessas células. Já para a linhagem HCT116-R, não foi observado índice celular negativo, mostrando que independente do tratamento utilizado houve um percentual de células migrando. As menores taxas observadas para HCT116-R nesse ensaio foram para os grupos TFD+L-OHP e TFD+L-OHP+CURC.

Para ambas as linhagens no ensaio de migração RTCA, os grupos expostos a CURC sem a presença da L-OHP tiveram uma tendência um pouco menor de bloqueio da capacidade

de migração celular. Entretanto, ainda assim podemos considerar como uma resposta relevante, visto que esse fármaco é indicado para ser utilizado de forma combinada com o quimioterápico, devido a ter ação adjuvante para aplicação da quimioterapia (ASHRAFIZADEH *et al.*, 2020; HOWELLS *et al.*, 2011; LAYOS; MARTÍNEZ-BALIBREA; RUIZ DE PORRAS, 2022; OZAWA-UMETA *et al.*, 2020; RUIZ DE PORRAS *et al.*, 2016; SHAIKH *et al.*, 2021).

Em seu trabalho, HERRERO DE LA PARTE *et al.* (2021) demonstraram que a CURC reduz a proliferação e migração de células de CRC, retardando o crescimento *in vivo* de metástases hepáticas em ratos. Vale ressaltar que o efeito da CURC foi dose-dependente, portanto, podemos inferir que o perfil observado aqui condiz com o esperado e descrito na literatura, mas compreende-se que ela por si não teria um papel tão efetivo na redução da migração nas condições aqui utilizadas.

Em sua revisão de literatura, LAYOS; MARTÍNEZ-BALIBREA; RUIZ DE PORRAS (2022) discorreram sobre o papel da CURC, na qual foi dito que a ela deve ser um fármaco adicionado ao tratamento quimioterápico padrão para CRC metastático, estando relacionado tanto com a redução dos efeitos colaterais da quimioterapia quanto com a superação da resistência à quimioterapia, resultado na melhoria da qualidade de vida do paciente. Por isso, incentiva-se fortemente que a CURC seja utilizada em estudos futuros.

Os dados de morte celular permitem inferir um papel importante da CURC no aumento da proporção de células necróticas para a linhagem sensível, sendo este perfil aumentando quando combinado com a TFD e/ou L-OHP, como observado para os grupos CURC, L-OHP+CURC, TFD+CURC e TFD+L-OHP+CURC, citados na ordem de menor até maior intensidade do marcador de necrose. Já para a linhagem HCT116-R, também foi possível inferir um papel importante da CURC no aumento da proporção de células necróticas, principalmente quando combinada com L-OHP e/ou TFD, como observado para os grupos L-OHP+CURC e TFD+L-OHP+CURC.

A possibilidade de redução da toxicidade associada a L-OHP mantendo a eficácia terapêutica, é um dado primordial para que possamos contrapor desafios no tratamento oncológico que estão ligados diretamente, não somente a sobrevida do paciente, mas também a qualidade de vida que costuma ser comprometida devido as altas doses necessárias de quimioterapia, conforme mencionado no início dessa sessão.

Podemos concluir que para todos os ensaios a combinação TFD+CURC+L-OHP teve uma tendência de apresentar as menores taxas dentre os grupos avaliados, principalmente para a linhagem HCT116-R, demonstrando ser uma boa abordagem terapêutica. Sendo assim,

considerando todas as observações mencionadas anteriormente, os grupos: TFD+CURC+L-OHP (R_Tripla) e o controle da linhagem HCT116-R(R_CTRL), bem como o grupo controle de HCT116-S (S_CTRL), foram escolhidos para avaliação dos DEGs por meio da técnica de RNAseq.

O heatmap das amostras enviadas para sequenciamento corroborou com o esperado, onde tivemos maior similaridade entre as duplicatas de uma mesma amostra e maior similaridade entre as amostras R_Tripla e R_CTRL, seguido de maior similaridade entre a R_CTRL e S_CTRL, e menor similaridade entre R_Tripla e S_CTRL.

Essa percepção ficou mais evidenciada no volcano plot e diagrama de venn apresentados na sessão de resultados, onde tivemos maior quantidade de DEGs nos comparativos R_Tripla x S_CTRL e R_CTRL x S_CTRL, evidenciando o observado ao longo desse trabalho quanto a obtenção de uma linhagem diferente da parental e evidentemente mais resistente a L-OHP. Enquanto isso foi encontrada uma menor quantidade de DEGs para o comparativo R_Tripla x R_CTRL, conforme esperando, por se tratar da mesma linhagem, apenas exposta ao tratamento combinatório, corroborando, portanto, com a percepção de maior similaridade entre esses grupos.

A análise de enriquecimento de processos biológicos evidenciou vias e processos cruciais para o desenvolvimento tumoral (resposta imune, metabolismo celular, transcrição e regulação da expressão gênica, adesão, migração, sinalização e morte celular, e resposta a estímulo químico). Quando comparados os grupos R_CTRL x S_CTRL, pôde-se observar a regulação negativa de algumas vias relacionadas ao processo transcrição e regulação da expressão gênica, bem como maior expressão da via descrita como regulação negativa da morte celular, indicando a presença de DEGs relacionados a evasão da apoptose.

Quando tratada, a linhagem HCT116-R teve uma tendência a aumentar a expressão dos genes envolvidos no processo transcrição e regulação da expressão gênica, comparado com as células HCT116-S não tratadas (comparativos R_Tripla x S_CTRL), o que pode indicar um perfil de resposta importante do tratamento aqui empregado. Além disso, também foi observada a regulação negativa de alguns genes envolvidos com resposta imune. O comparativo R_Tripla x R_CTRL demonstrou DEGs envolvidos em metabolismo celular, processo biológicos, função molecular, superfície celular e transportadores transmembranares.

Em seu trabalho, ZHANG *et al.* (2018) compararam a célula HCT-8 resistente com sua célula parental/sensível. Os autores demonstraram que a indução de resistência levou a mudanças significativas na expressão de genes e proteínas relacionadas ao perfil MDR, com

aumentos na proteína de reparo do DNA (ERCC1), bomba de efluxo (ABCB1 e ABCC1) e GSTP1, relacionados à detoxificação de drogas.

No presente estudo, por meio da análise de enriquecimento, foi visto uma expressão reduzida dos DEGS relacionados a detoxificação no comparativo R_Tripla x S_CTRL, presente apenas nesse comparativo. Isso pode ser um indicador do papel do tratamento trimodal na redução de genes que possam estar atuando nessa via de resistência. Dentre todos os DEGs encontrados, foram escolhidos 20 genes que estão descritos na literatura como tendo um papel importante no CRC para que possam ser investigados posteriormente por meio da técnica de RT-qPCR. Dentre eles, alguns serão citados e discutidos a seguir.

Para o gene ABCB1, foi obtida uma expressão diferencial UP, porém ainda considerada baixa, no comparativo R_tripla x R_CTRL, já no comparativo R_CTRL x S_CTRL observou-se uma expressão ainda menor desse gene, ao comparar os mesmos grupos após o tratamento da célula resistente R_Tripla x S_CTRL também se observou uma expressão significativa reduzida.

Em seu trabalho, WU *et al.* (2021) estabeleceram uma linhagem celular de CRC resistente a irinotecano (S1-IR20), em seus resultados obtidos pela análise de western blot, foi visto que as células S1-IR20 apresentaram um aumento na expressão de ABCG2, mas não na expressão de ABCB1 ou ABCC1 comparada com a linhagem parental. HSU *et al.* (2018) também observaram que a linhagem celular LoVo resistente a L-OHP desenvolvida por eles teve uma expressão elevada do mRNA e proteína de ABCG2, quando tratadas com oxaliplatina, 5-FU e CPT-11. Dessa forma, a redução na expressão de ABCB1 nas células HCT116-R (controle e tripla) corrobora com o observado por outros autores, indicando que esse gene não representa mecanismo ligado a resistência aqui observada.

O papel do gene BAX foi demonstrado no trabalho de MCCURRACH *et al.* (1997), onde os autores viram que o BAX estaria funcionando como um efetor de p53 na apoptose induzida por quimioterapia e contribui para a supressão tumoral por meio da via de p53. Sendo, portanto, considerado que o gene BAX é um determinante/marcador de quimiossensibilidade dependente de p53.

Nesse sentido, aqui discutiremos em conjunto os genes BAX e TP53I3, que se encontraram aumentados quando as células HCT116-R foram tratadas. De acordo com o exposto por CHAUVIN *et al.* (2022), TP53I3 é ativado transcricionalmente por p53, desempenhando um possível papel na resposta ao dano do DNA e na apoptose induzida por ROS. Em seu trabalho, os autores demonstraram que a linhagem celular HCT116, após o

tratamento com 5-FU, teve um aumento de proteínas envolvidas na via de sinalização P53, especialmente a proteína pró-apoptótica BAX e TP53I3, as quais também estavam aumentadas no nível transcriptômico. Nesse sentido, podemos inferir que o tratamento trimodal parece estar induzindo apoptose por meio do aumento da expressão de BAX e TP53I3.

O papel de BAX na resistência do CRC também foi avaliado por MANOOCHEHRI *et al.* (2014). Em seu trabalho, os autores mostraram que genes pró-apoptóticos, como BAX, foram regulados negativamente em células HT-29 resistentes em comparação com células HT-29 parental. Ao final, os autores concluíram que há uma regulação negativa de BAX contribuindo para o desenvolvimento do CRC e da resistência celular ao 5-FU.

Para este trabalho, apesar do comparativo R_CTRL x S_CTRL não ter identificado uma grande diferença na expressão de BAX, quando olhamos para os dados de R_triplo x S_CTRL podemos inferir que a terapia utilizada aqui parece estar aumentando a expressão desse gene, o que seria indicativo de um aumento na cascata apoptótica. Essa observação foi semelhante ao exposto por YANG *et al.* (2011), onde os autores mostraram que a L-OHP lipossomal aumentou a expressão do gene BAX comparado com L-OHP não lipossomal em modelo murino.

Existem poucos estudos sobre o papel de WNT7A no CRC. Entretanto, NIE *et al.* (2020) trouxeram que WNT7A é considerado um ligante crucial na via de sinalização canônica de WNT, mencionando que para CRC esse gene tem sido associado como tendo um papel protetor para o desenvolvimento tumoral. ZHU *et al.* (2021) também destacaram que a via sinalização canônica Wnt/ β -catenina está associada ao perfil das CSC, além de ter papel na melhora da resistência aos medicamentos por meio da promoção da expressão de transportadores ABC. Considerando que a expressão desse gene não teve muita diferença entre a R_CTRL e a S_CTRL, porém ele se encontrou aumentado após o tratamento (R_triplo), podemos inferir que há um papel importante desse gene na resposta de HCT116-R ao tratamento trimodal, quando comparado com os demais grupos, indicando um provável mecanismo de escape ou resistência ao tratamento nessa linhagem.

No que se refere ao gene TESC, HEE KANG *et al.* (2014) observaram que o knockdown de TESC inibiu a via NF- κ B dependente de Akt e diminuiu a sobrevivência celular *in vitro*. No presente estudo, observamos que a expressão desse gene já se encontra reduzida na HCT116-R, porém há um aumento nessa redução no comparativo R_triplo x S_CTRL, bem como há uma expressão DOWN significativa entre R_triplo e R_CTRL. Nesse sentido, podemos sugerir aqui uma possível inibição de TESC por meio do tratamento empregado.

Um outro gene importante foi o CDKN1A, também conhecido como p21, o qual apareceu aumentado para HCT116-R tratadas quando comparadas a R_CTRL e S_CTRL. Nas análises de enriquecimento feitas por meio da plataforma Enrich R, o CDKN1A apareceu em quase todas as vias, sugerindo um papel importante na resposta obtida após o tratamento. Em seu trabalho, BUENO-FORTES *et al.* (2022) utilizaram a linhagem HCT116 p21^{-/-} e avaliaram que houve uma UP regulação de genes envolvidos no perfil do subtipo mesenquimal CMS4 de CRC, significativamente associado a mau prognóstico devido a maior malignidade do tumor (maior capacidade migratória, alta capacidade stemness e resistência a drogas).

Além disso, CDKN1A é conhecido por sua associação direta com a cascata de p53, o qual é responsável pela transativação de p21, levando a progressão do ciclo celular em G1, promovendo a interrupção da síntese de DNA e parada do ciclo celular (ZHU *et al.*, 2019). Em resposta ao dano no DNA, esta cascata levará a inibição do ciclo celular e, conseqüentemente, apoptose, como demonstrado e discutido por KIM & KIM (2007) ao avaliarem a presença de p21 em 35 tumores provenientes de pacientes com CRC. Sendo assim, em conjunto com o observado para BAX e TP53I3, podemos concluir que a expressão elevada de CDKN1A representa uma perspectiva de eficácia positiva para o tratamento aqui utilizado.

Um outro gene que vamos comentar aqui é o CYP24A1, o qual tem papel na disponibilidade da vitamina D. De acordo com os dados da literatura, CYP24A1 codifica a enzima 24-hidroxilase que inicia a degradação do metabólito ativo da vitamina D (1,25-(OH)₂ vitamina D), a qual é associada como um fator preventivo e protetor contra o desenvolvimento do CRC (FELDMAN *et al.*, 2014; FERNÁNDEZ-BARRAL *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019; SEDLAK; YILMAZ; ROPER, 2023; VAUGHAN-SHAW *et al.*, 2020).

Em seu trabalho, LI *et al.* (2019) avaliaram a expressão de CYP24A1 a fim de identificar o seu papel na concentração de insulina em uma população da província de Henan (China), onde viram que um maior número de cópias de CYP24A1 foi um fator de risco para deficiência de vitamina D, correlacionado positivamente com a concentração de insulina sérica.

No artigo publicado por CHAI *et al.* (2021) os autores relatam que a deficiência de vitamina D está associada a variedade de tumores, incluindo CRC. Eles também discorreram que a suscetibilidade ao CRC foi associada às mutações do gene CYP24A1, o qual estaria agindo por meio da via WNT. Ao avaliar o perfil desse gene na população de Jiamusi (China), os autores relataram que este pode ser um fator de risco genético relacionado com a maior prevalência de CRC nessa população. Nesse mesmo sentido, HORVÁTH *et al.* (2010) encontraram uma correlação significativa entre a expressão de CYP24A1 e Ki-67 (marcador de

atividade proliferativa), revelando que tecidos com altos níveis de expressão de CYP24A1 têm uma taxa de proliferação aumentada.

Diante disso, a baixa expressão de CYP24A1 para as células HCT116-R após o tratamento pode ser correlacionada como um indicador de prognóstico positivo da terapia trimodal aplicada no presente estudo. Vale ressaltar que na análise funcional realizada por meio da plataforma Enrich R, foi vista uma sobreposição dos genes CDKN1A, ABCB1, STEAP4 e CYP24A1 para a via “Vitamin D Receptor Pathway WP2877”, corroborando com a literatura quanto ao papel dessa via no desenvolvimento do CRC, mas também associando outros genes.

Por fim, um outro gene que pode ter um mecanismo envolvido diretamente com os dados aqui apresentados e pode ser visto como um marcador de eficácia é o gene GRHL3. Esse tem papel no crescimento tumoral, metástase e no reparo de feridas/cicatrização (TAN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017). Como pode-se observar, esse é gene se encontrou UP regulado no comparativo R_CTRL x S_CTRL, assim como no comparativo R_tripla x R_CTRL. Entretanto, ao comparar a expressão diferencial de GRHL3 nas células HCT116-R após tratamento trimodal foi observada uma redução expressiva desse gene no comparativo R_tripla x S_CTRL, indicando um possível mecanismo associado a GRHL3 do tratamento nas células HCT116-R, o que corroborou com o observado nos ensaios de migração pela técnica de scratch e no ensaio em tempo real.

Um outro ponto importante a ser mencionado foi o descritor “Photodynamic therapy-induced AP-1 survival signaling. WP3611” observado na análise de enriquecimento por meio do Enrich R, o qual teve correlação com os genes CDKN1A e BAX. Como já mencionado no capítulo introdutório desse trabalho, a TFD leva a produção de ROS, culminando em uma cascata de sinalização que induzirá estresse celular e morte por apoptose ou necrose (DOS SANTOS *et al.*, 2018; KAWCZYK-KRUPKA *et al.*, 2016).

BROEKGAARDEN *et al.* (2015) trouxeram em sua revisão de literatura que o estresse celular ocasionado pela produção de ROS por meio da TFD desencadeia uma resposta das células tumorais para lidar com o estresse oxidativo e evitar danos celulares, conhecido como resposta aguda ao estresse. Os autores trouxeram que os mecanismos/vias de sobrevivência são mediados por diversos fatores que visam proteger a célula do estresse, entre eles está a proteína ativadora de fatores de transcrição 1 (AP-1). Resumidamente, as ROS podem ativar o fator de transição NRF2 (NFE2 like bZIP transcription factor 2), o qual irá se translocar para o núcleo e dimerizar com AP-1 para iniciar a transcrição de enzimas antioxidantes e bombas de efluxo (ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC6 e ABCG2). De forma complementar, cabe ressaltar que a

CURC tem ação conhecida na regulação de AP-1, conforme relatado por WONG *et al.* (2019), o que pode significar uma atuação conjunta dessas terapias na resposta aqui observada.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 32. No geral, os dados indicam que as células HCT116-R estabelecidas aqui exibem características do perfil MDR, as quais quando tratadas com a terapia TFD+L-OHP+CURC apresentaram a perspectiva de redução da capacidade de reincidência tumoral, redução da capacidade metastática, aumento da taxa de morte celular, além de desencadear alterações na expressão (UP/DOWN) de genes relacionados a vias de sinalização importantes para o sucesso e/ou fracasso do tratamento do CRC resistente, como o aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo celular/funções moleculares/transcrição e regulação gênica/ativação da resposta imune e redução da expressão de genes relacionados aos transportadores transmembranares/adesão/migração/sinalização celular.

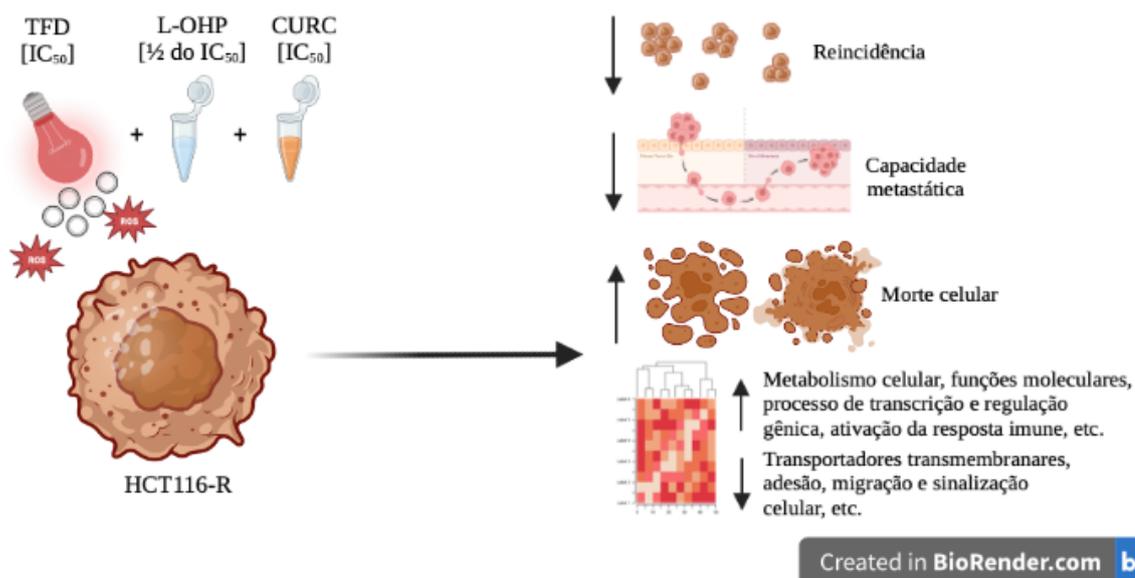


Figura 32 – Resumo geral dos resultados observados. CURC: curcumina livre; L-OHP: oxaliplatina; TFD: terapia fotodinâmica mediada pela NE-AIClFt, seguido da exposição ao LED. Figura criada com BioRender.com.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O protocolo utilizado para aquisição da linhagem resistente à L-OHP é eficaz e viável de ser reproduzido. Como pôde-se perceber, os dados aqui apresentados corroboram com o demonstrado por diversos autores, entre eles EL KHOURY *et al.* (2016) sobre como a aquisição do perfil MDR está em partes associada ao surgimento de células com algumas características de CSC. No ANEXO I se encontra o artigo publicado sobre o estabelecimento e caracterização da linhagem HCT116-R, intitulado: “Establishment and characterization of oxaliplatin-resistant human colorectal cancer cell line”.

A linhagem resistente aqui obtida pode ser utilizada para o estudo de novos tratamentos que possam contribuir para a reversão da resistência à L-OHP, estudos voltados a compreensão de mecanismos de MDR, investigação da relação da aquisição de perfil senescente para escape da morte celular por L-OHP, bem como para entendimento de como um tumor resistente pode estar respondendo a terapia e os mecanismos moleculares por trás dessa resposta

Por meio da abordagem de indução de resistência à L-OHP na linhagem celular HCT116 seguido da exposição a diferentes combinações terapêuticas de TFD, L-OHP e CURC, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, o potencial terapêutico dessa combinação de tratamentos em linhagem resistente por meio de diferentes ensaios e à nível molecular. No geral, a TFD medida pela NE-AICIFt mostrou ser uma boa abordagem para pré-sensibilizar as células HCT116-R ao tratamento com L-OHP e/ou curcumina.

No geral, as análises de viabilidade, citotoxicidade, migração, perfil de morte celular, bem como a análise do transcriptoma, corroboraram entre si e fortaleceram a percepção de eficácia do tratamento combinatório TFD+L-OHP+CURC na linhagem HCT116-R, devendo-se destacar que a concentração de L-OHP utilizada foi $\frac{1}{2}$ do valor de IC_{50} dessas células. Portanto, mesmo utilizando uma concentração baixa da quimioterapia, foi possível manter a eficácia terapêutica, sem necessidade de aumentar a concentração do quimioterápico, trazendo a perspectiva futura de redução de efeito tóxicos comumente associados a utilização da L-OHP.

Por fim, os dados apresentados aqui devem ser utilizados para fomentar futuros trabalhos voltados para: validação dos 20 genes destacados como candidatos por meio da técnica RT-qPCR (em andamento); estudos sobre a presença de células senescentes na linhagem HCT116-R tratada com altas concentrações de L-OHP; investigação da eficácia de utilização da curcumina nanoestrutura em modelo *in vivo*; avaliação da aplicabilidade, desafios e eficácia do tratamento combinatório em modelo animal (*in vivo*); investigação da aquisição de resistência cruzada a outros medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL BITAR, S. *et al.* Molecular mechanisms targeting drug-resistance and metastasis in colorectal cancer: Updates and beyond. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 9, p. 1395–1426, 7 mar. 2023.
- ALIAN, O. M.; AZMI, A. S.; MOHAMMAD, R. M. Network insights on oxaliplatin anti-cancer mechanisms. **Clinical and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, dez. 2012.
- ALMENDRO, V. *et al.* The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 6 mar. 2009.
- ANITHA, A. *et al.* Combinatorial nanomedicines for colon cancer therapy. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 1, p. 151–159, 1 jan. 2016.
- ARNOULD, S. *et al.* Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 39, p. 112–119, 2003.
- ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. **ecancermedicalsecience**, v. 9, 9 abr. 2015.
- ASHRAFIZADEH, M. *et al.* Curcumin in cancer therapy: A novel adjunct for combination chemotherapy with paclitaxel and alleviation of its adverse effects. **Life Sciences**, v. 256, n. 117984, 1 set. 2020.
- ATALLAH, D. *et al.* Thermal enhancement of oxaliplatin-induced inhibition of cell proliferation and cell cycle progression in human carcinoma cell lines. **International Journal of Hyperthermia**, v. 20, n. 4, p. 405–419, jun. 2004.
- BADIC, B. *et al.* Prognostic impact of cancer stem cell markers ABCB1, NEO1 and HIST1H2AE in colorectal cancer. **Am J Transl Res**, v. 12, n. 9, p. 5797–5807, 2020.
- BAHRAMI, A.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Curcumin: a potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. **Cellular Oncology**, v. 42, n. 4, p. 405–421, 1 ago. 2019.
- BÁRTU, M. *et al.* Expression, Epigenetic, and Genetic Changes of HNF1B in Colorectal Lesions: an Analysis of 145 Cases. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, n. 4, p. 2337–2350, 1 out. 2020.
- BINEFA, G. *et al.* Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 22, p. 6786–6808, 2014a.
- BINEFA, G. *et al.* Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 22, p. 6786–6808, 2014b.

BITEGHE, F. N.; DAVIDS, L. M. A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 18–27, 1 jan. 2017.

BRAUN, M. S.; SEYMOUR, M. T. Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 3, n. 1, p. 43–52, 2011.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, 2014.

BROEKGAARDEN, M. *et al.* Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 4, p. 643–690, 1 dez. 2015.

BUENO-FORTES, S. *et al.* A gene signature derived from the loss of *cdkn1a* (P21) is associated with CMS4 colorectal cancer. **Cancers**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2022.

BUSUIOC, C. *et al.* Analysis of Differentially Expressed Genes, MMP3 and TESC, and Their Potential Value in Molecular Pathways in Colon Adenocarcinoma: A Bioinformatics Approach. **BioMedInformatics**, v. 2, n. 3, p. 474–491, 3 set. 2022.

CAPONERO, R.; MONTARROYOS, E. S.; TAHAMTANI, S. M. M. Post-chemotherapy neuropathy. **Revista Dor**, v. 17, 2016.

CEBALLOS, M. P. *et al.* ABC Transporters: Regulation and Association with Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma and Colorectal Carcinoma. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1224–1250, 6 fev. 2019.

CHAI, L. *et al.* Association of CYP24A1 gene polymorphism with colorectal cancer in the Jiamusi population. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June 2021, 1 jun. 2021.

CHANG, B.-D. *et al.* Role of p53 and p21 waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. **Oncogene**, v. 18, p. 4808–4818, 1999.

CHAUDHRY, S. R. *et al.* Germline mutations in apoptosis pathway genes in ovarian cancer; the functional role of a TP53I3 (PIG3) variant in ROS production and DNA repair. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, 1 jun. 2021.

CHAUVIN, A. *et al.* Downregulation of KRAB zinc finger proteins in 5-fluorouracil resistant colorectal cancer cells. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.

CHEN, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 128, 2013.

CHEN, L.; KE, X. MMP7 as a potential biomarker of colon cancer and its prognostic value by bioinformatics analysis. **Medicine**, v. 100, n. 9, p. e24953, 5 mar. 2021.

CHEN, X.; ZHANG, W.; XU, X. Cyanidin-3-glucoside suppresses the progression of lung adenocarcinoma by downregulating TP53I3 and inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 15 jan. 2010.

CHOU, T.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. . **Adv Enzyme Regul**, v. 22, p. 27–55, 1984.

CHOU, T.-C.; MARTIN, N. CompuSyn for Drug Combinations and for General Dose-Effect Analysis User's Guide A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC 50 , ED 50 , and LD 50 Values. 2005.

CIARDIELLO, F. *et al.* Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 4, p. 372–401, jul. 2022.

COMELLA, P. *et al.* Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, n. 1, p. 229–238, 2009.

CONDE, J. *et al.* Local triple-combination therapy results in tumour regression and prevents recurrence in a colon cancer model. **Nature Materials**, v. 15, n. 10, p. 1128–1138, 1 out. 2016.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 1 fev. 2018.

DOS SANTOS, M. S. C. *et al.* Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, 30 jan. 2018.

DU, B. *et al.* Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. **Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 23–28, dez. 2005.

DU, Y. X. *et al.* Natural Compounds Targeting the Autophagy Pathway in the Treatment of Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, 1 abr. 2023.

EL KHOURY, F. *et al.* Acquisition of anticancer drug resistance is partially associated with cancer stemness in human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 6, p. 2558–2568, 1 dez. 2016.

ESCALANTE, P. I.; QUIÑONES, L. A.; CONTRERAS, H. R. pharmaceuticals Epithelial-Mesenchymal Transition and MicroRNAs in Colorectal Cancer Chemoresistance to FOLFOX. 2021.

FAN, Y. X. *et al.* Mechanism of reversal of multidrug resistance by curcumin in human colorectal cancer cell line HCT-8/5-FU. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 29 jun. 2017.

FELDMAN, D. *et al.* The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 342–357, 2014.

FENG, R.; DONG, L. Original Article Knockdown of microRNA-127 reverses adriamycin resistance via cell cycle arrest and apoptosis sensitization in adriamycin-resistant human glioma cells. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 6, p. 6107–6116, 2015.

FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FERNÁNDEZ, L. P. *et al.* The role of glycosyltransferase enzyme GCNT3 in colon and ovarian cancer prognosis and chemoresistance. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

FERNÁNDEZ-BARRAL, A. *et al.* Vitamin D differentially regulates colon stem cells in patient-derived normal and tumor organoids. **FEBS Journal**, v. 287, n. 1, p. 53–72, 1 jan. 2020.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, abr. 2005.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, dez. 2006.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

GANASSIN, R. *et al.* Decoration of a Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)-Shelled Selol Nanocapsule with Folic Acid Increases Its Activity Against Different Cancer Cell Lines In Vitro. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 1, p. 522–528, 29 set. 2018.

GANASSIN, R. **Indução de morte celular imunogênica em células cancerosas murinas CT26 por curcumina.** . Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia).—Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2020.

GEBREMEDHN, E. G.; SHORTLAND, P. J.; MAHNS, D. A. The incidence of acute oxaliplatin-induced neuropathy and its impact on treatment in the first cycle: A systematic review. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 12 abr. 2018.

GELLES, J. D. *et al.* Single-Cell and Population-Level Analyses Using Real-Time Kinetic Labeling Couples Proliferation and Cell Death Mechanisms. **Developmental Cell**, v. 51, n. 2, p. 277- 291.e4, 21 out. 2019.

GERA, M. *et al.* Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66680–66698, 2017.

GILLET, J. P.; GOTTESMAN, M. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 1–2, p. 2–4, fev. 2012.

GOGOI, P.; KAUR, G.; SINGH, N. K. Nanotechnology for colorectal cancer detection and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 46, p. 6497–6511, 14 dez. 2022.

GONZÁLEZ-VALLINAS, M. *et al.* Expression of MicroRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 3 jun. 2014.

GONZÁLEZ-VALLINAS, M. *et al.* Clinical relevance of the differential expression of the glycosyltransferase gene GCNT3 in colon cancer. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 1, p. 1–8, 2015.

GOPANENKO, A. V. *et al.* Knockdown of the Ribosomal Protein eL29 in Mammalian Cells Leads to Significant Changes in Gene Expression at the Transcription Level. **Cells**, v. 9, n. 5, 15 maio 2020.

GÖSCHL, S. *et al.* Comparative studies of oxaliplatin-based platinum(IV) complexes in different in vitro and in vivo tumor models. **Metalomics : integrated biometal science**, v. 9, n. 3, p. 309–322, 22 mar. 2017.

GOTTESMAN, M. M. MECHANISMS OF CANCER DRUG RESISTANCE. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 615–27, 2002.

GOU, M. *et al.* Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1558–1567, abr. 2011.

GOWDA, R. *et al.* Use of nanotechnology to develop multi-drug inhibitors for cancer therapy. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**, v. 4, n. 6, 2013.

GU, Y. *et al.* TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through WNT/ β -catenin and MAPK signalling. **Journal of Pathology**, v. 239, n. 1, p. 60–71, 1 maio 2016.

GUIDOLIN, K. *et al.* Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: A Systematic Review of Clinical Research. **Surgical Innovation**, v. 29, n. 6, p. 788–803, 1 dez. 2022.

GUINNEY, J. *et al.* The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. **Nat Med.**, 2015.

GUPTA, N. *et al.* Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 2, p. 571–577, 5 maio 2006.

GZIL, A. *et al.* The essential role of DCLK1 in pathogenesis, diagnostic procedures and prognostic stratification of colorectal cancer. **Anticancer Research**, v. 39, n. 6, p. 2689–2697, 2019.

HAN, S. H. *et al.* Prognostic implication of ABC transporters and cancer stem cell markers in patients with stage iii colon cancer receiving adjuvant FOLFOX-4 chemotherapy. **Oncology Letters**, v. 17, n. 6, p. 5572–5580, 1 jun. 2019.

HE, C. *et al.* Core-shell nanoscale coordination polymers combine chemotherapy and photodynamic therapy to potentiate checkpoint blockade cancer immunotherapy. **Nature Communications**, v. 7, 17 ago. 2016.

HE, W. TING *et al.* Curcumin Reverses 5-Fluorouracil Resistance by Promoting Human Colon Cancer HCT-8/5-FU Cell Apoptosis and Down-regulating Heat Shock Protein 27 and P-Glycoprotein. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 25, n. 6, p. 416–424, 1 jun. 2019.

HE, Y. C. *et al.* **Nanomedicine-based multimodal therapies: Recent progress and perspectives in colon cancer.** **World journal of gastroenterology**NLM (Medline), , 28 jan. 2023.

HEE KANG, Y. *et al.* The EF-hand calcium-binding protein tescalcin is a potential oncotarget in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 8, 2014.

HERRERO DE LA PARTE, B. *et al.* Curcumin reduces colorectal cancer cell proliferation and migration and slows in vivo growth of liver metastases in rats. **Biomedicines**, v. 9, n. 9, 1 set. 2021.

HODGKINSON, N.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 1–17, 1 out. 2017.

HOFFMANN, E. K.; LAMBE, I. H. Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1638, 19 mar. 2014.

HONG, M. *et al.* RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2020.

HORVÁTH, H. C. *et al.* The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 277–285, mar. 2010.

HOWELLS, L. M. *et al.* Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 2, p. 476–486, 15 jul. 2011.

HOWELLS, L. M.; MITRA, A.; MANSON, M. M. Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 1, p. 175–183, 1 jul. 2007.

HSIEH, F. L. *et al.* Structure of WNT inhibitor adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 (APCDD1), a cell-surface lipid-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 20, 16 maio 2023.

HSU, H. H. *et al.* Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 7, p. 5458–5467, 1 jul. 2018.

HU, T. *et al.* Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 30, p. 6876–6889, 14 ago. 2016a.

HU, T. *et al.* Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 30, p. 6876–6889, 14 ago. 2016b.

IDOUDI, S. *et al.* Curcumin and Derivatives in Nanoformulations with Therapeutic Potential on Colorectal Cancer. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 5, 1 jul. 2022.

INCA. **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2023.

JENSEN, N. F. *et al.* Establishment and characterization of models of chemotherapy resistance in colorectal cancer: Towards a predictive signature of chemoresistance. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 6, p. 1169–1185, 1 jun. 2015.

JEONG, E. *et al.* Analysis of cross-association between mRNA expression and RNAi efficacy for predictive target discovery in colon cancers. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 1 nov. 2020.

JIANG, Y.; LIAO, H. L.; CHEN, L. Y. A Pan-Cancer Analysis of SLC12A5 Reveals Its Correlations with Tumor Immunity. **Disease Markers**, v. 2021, 2021.

JOANITTI, G. A. *et al.* Nanomedicine-mediated therapies to target breast cancer stem cells. **Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 224–236, 2017.

KANG, J. *et al.* Tescalcin expression contributes to invasive and metastatic activity in colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 13843–13853, 1 out. 2016.

KAP, E. J.; POPANDA, O.; CHANG-CLAUDE, J. Nucleotide excision repair and response and survival to chemotherapy in colorectal cancer patients. **Pharmacogenomics**, v. 17, n. 7, p. 755–794, 1 maio 2016.

KAWCZYK-KRUPKA, A. *et al.* Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment-The state of the art in preclinical research. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 158–174, 1 mar. 2016.

KIM, N. *et al.* RNA-sequencing identification and validation of genes differentially expressed in high-risk adenoma, advanced colorectal cancer, and normal controls. **Functional and Integrative Genomics**, v. 21, n. 3–4, p. 513–521, 1 jul. 2021.

KIM, T.-J.; KIM, T.-G. Correlation Between p53 and p21 Proteins Expression and Prognostic Factors Related with Colon Cancer. **Korean Soc. Clin. Lab. Sci**, v. 39, n. 2, p. 128–135, 2007.

KIRIKOSHI, H.; KATOH, M. Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY**, v. 21, p. 895–900, 2002.

KOBUCHI, S.; SHIMIZU, R.; ITO, Y. Semi-mechanism-based pharmacokinetic-toxicodynamic model of oxaliplatin-induced acute and chronic neuropathy. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020.

KOPEL, J. *et al.* Global Impact of COVID-19 on Colorectal Cancer Screening: Current Insights and Future Directions. **Medicina (Lithuania)**, v. 58, n. 1, 1 jan. 2022.

KULESHOV, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. W90–W97, 8 jul. 2016.

LAI, P. L. *et al.* Selection of a malignant subpopulation from a colorectal cancer cell line. **Oncology Letters**, v. 20, n. 3, p. 2937–2945, 1 set. 2020.

LARASATI, Y. A. *et al.* Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

- LAYOS, L.; MARTÍNEZ-BALIBREA, E.; RUIZ DE PORRAS, V. Curcumin: A Novel Way to Improve Quality of Life for Colorectal Cancer Patients? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, 1 nov. 2022.
- LEONARD, G. D. *et al.* Survey of oxaliplatin-associated neurotoxicity using an interview-based questionnaire in patients with metastatic colorectal cancer. **BMC Cancer**, v. 5, 16 set. 2005.
- LEUNG, W. H. *et al.* Preclinical Identification of Sulfasalazine's Therapeutic Potential for Suppressing Colorectal Cancer Stemness and Metastasis through Targeting KRAS/MMP7/CD44 Signaling. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2022.
- LI, C. *et al.* Wnt7a Promotes the Occurrence and Development of Colorectal Adenocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 9 mar. 2021.
- LI, T. *et al.* FOXF2 Regulates PRUNE2 Transcription in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 21, 2022a.
- LI, T. *et al.* PRUNE2 inhibits progression of colorectal cancer in vitro and in vivo . **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 23, n. 2, 27 dez. 2022b.
- LI, X. *et al.* Associations of cyp24a1 copy number variation with vitamin d deficiency and insulin secretion. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 44, n. 12, p. 1367–1370, 2019.
- LIAO, Y. *et al.* Inflammation mobilizes copper metabolism to promote colon tumorigenesis via an IL-17-STEAP4-XIAP axis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.
- LIM, E. J. *et al.* ICAM-1 promotes cancer progression by regulating SRC activity as an adapter protein in colorectal cancer. **Cell Death and Disease**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2022.
- LIN, S. *et al.* Enhancement of oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer by hypericin mediated photodynamic therapy via ROS-related mechanism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 71, p. 24–34, 1 fev. 2016.
- LINARES, J. *et al.* Long-term platinum-based drug accumulation in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal cancer progression and resistance to therapy. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023.
- LIU, H. *et al.* Correlations between TBL1XR1 and recurrence of colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 7, 15 mar. 2017.
- LIU, L. B.; LIU, T.; XIN, F. Z. Correlations of ICAM-1 gene polymorphisms with susceptibility and multidrug resistance in colorectal cancer in a Chinese population. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 33, 1 ago. 2017.

LIU, Z. *et al.* Establishment and biological characteristics of oxaliplatin resistant human colon cancer cell lines. **Chin J Cancer**, v. 29, n. 7, p. 661–7, 2010.

LIU, Z. *et al.* Preventive effect of Curcumin against chemotherapy-induced side-effects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 27 nov. 2018.

LOPES-RODRIGUES, V.; SOUSA, E.; VASCONCELOS, M. H. Curcumin as a modulator of P-glycoprotein in cancer: Challenges and perspectives. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 71, 10 nov. 2016.

LU, S.; JIA, C.-Y.; YANG, J.-S. Future therapeutic implications of new molecular mechanism of colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 29, n. 16, p. 2359–2368, 28 abr. 2023.

LUO, T.; ZHANG, Q.; LU, Q. BIN. Combination of near infrared light-activated photodynamic therapy mediated by indocyanine green with etoposide to treat non-small-cell lung cancer. **Cancers**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2017.

MA, S. C. *et al.* Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer. **Cancer Medicine**, 2023.

MA, X. *et al.* Mechanisms on chemotherapy resistance of colorectal cancer stem cells and research progress of reverse transformation: A mini-review. **Front Med (Lausanne)**, v. 9, n. 995882, 2022.

MAKINO, S. *et al.* DCLK1 integrates induction of TRIB3, EMT, drug resistance and poor prognosis in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 3, p. 303–312, 14 maio 2020.

MANOOCHEHRI, M. *et al.* Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-fu in colorectal cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 20, n. 2, p. 301–307, 1 abr. 2014.

MANSOORI, B. *et al.* The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339–348, 2017.

MARIADASON, J. M.; ARANGO, D.; AUGENLICHT, L. H. Customizing chemotherapy for colon cancer: The potential of gene expression profiling. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 3, p. 209–218, 2004.

MARTIN, L. P.; HAMILTON, T. C.; SCHILDER, R. J. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1291–1295, 1 mar. 2008.

MARTINEZ-BALIBREA, E. *et al.* Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 8, p. 1767–1776, 1 ago. 2015.

MARTINI, G. *et al.* Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 26, p. 4675–4688, 14 jul. 2017.

MARTINI, G. *et al.* Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 12, 2020.

MARTINS-GOMES, C.; SILVA, A. M. Natural Products as a Tool to Modulate the Activity and Expression of Multidrug Resistance Proteins of Intestinal Barrier. **Journal of Xenobiotics**, v. 13, n. 2, p. 172–192, 25 mar. 2023.

MAZIDIMORADI, A. *et al.* Impact of the COVID-19 Pandemic on Colorectal Cancer Diagnosis and Treatment: a Systematic Review. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 51, n. 1, p. 171–187, 1 mar. 2023.

MCCURRACH, M. E. *et al.* bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. **Cell Biology**, v. 94, p. 2345–2349, 1997.

MENTER, D. G. *et al.* Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. **Current Gastroenterology Reports**, v. 21, n. 2, 1 fev. 2019.

MODEST, D. P.; PANT, S.; SARTORE-BIANCHI, A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 109, p. 70–83, 1 mar. 2019.

MOHAMMADI, C. *et al.* DCLK1 Inhibition Sensitizes Colorectal Cancer Cells to Radiation Treatment. **Int J Mol Cell Med**, v. 10, n. 1, p. 23–33, 2021.

MONTOPOLI, M. *et al.* Cell-cycle inhibition and apoptosis induced by curcumin and cisplatin or oxaliplatin in human ovarian carcinoma cells. **Cell Proliferation**, v. 42, n. 2, p. 195–206, abr. 2009.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUEHLMANN, A. L. *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, 13 maio 2015.

NEERATI, P.; SUDHAKAR, Y. A.; KANWAR, J. R. Curcumin Regulates Colon Cancer by Inhibiting P-Glycoprotein in In-situ Cancerous Colon Perfusion Rat Model. **J Cancer Sci Ther**, v. 5, p. 313–319, 2014.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Platinum(II) complexes in cancer therapy. **Revista Virtual de Quimica**, v. 3, n. 3, p. 196–209, 2011.

NIE, X. *et al.* Emerging Roles of Wnt Ligands in Human Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. 1341, 14 ago. 2020.

NORATTO, G. D. *et al.* The drug resistance suppression induced by curcuminoids in colon cancer SW-480 cells is mediated by reactive oxygen species-induced disruption of the microRNA-27a-ZBTB10-Sp axis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1638–1648, set. 2013.

OJO, O. A. *et al.* Anticancer Properties of Curcumin Against Colorectal Cancer: A Review. **Frontiers in Oncology**, v. 12, n. 881641., 22 abr. 2022.

OZAWA-UMETA, H. *et al.* Curcumin β -D-glucuronide exhibits anti-tumor effects on oxaliplatin-resistant colon cancer with less toxicity in vivo. **Cancer Science**, v. 111, n. 5, p. 1785–1793, 1 maio 2020.

PAPACHRISTOPOULOU, G. *et al.* Uncovering the clinical impact of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) mRNA expression in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 2019.

PENG, S. *et al.* Enhancement of Curcumin Bioavailability by Encapsulation in Sophorolipid-Coated Nanoparticles: An in Vitro and in Vivo Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1488–1497, 14 fev. 2018.

PEREGO, P.; ROBERT, J. Oxaliplatin in the era of personalized medicine: From mechanistic studies to clinical efficacy Cytotoxic Reviews Godefridus J. Peters and Eric Raymond. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 1, p. 5–18, 1 jan. 2016.

PRYCZYNICZ, A. *et al.* Bax protein may influence the invasion of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 5, p. 1305–1310, 7 fev. 2014.

RAMASAMY, T. S. *et al.* Targeting colorectal cancer stem cells using curcumin and curcumin analogues: Insights into the mechanism of the therapeutic efficacy. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 96, 9 out. 2015.

REN, Y. *et al.* TUSC3 induces drug resistance and cellular stemness via Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 12, p. 1755–1766, 2020.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J.-L. Wound-Healing Assay. **From: Methods in Molecular Biology**, v. 294, p. 23–9, 2005.

ROTH V. **Doubling Time Computing**. .

RUIZ DE PORRAS, V. *et al.* Curcumin mediates oxaliplatin-acquired resistance reversion in colorectal cancer cell lines through modulation of CXCL1-Chemokine/NF- κ B signalling pathway. **Scientific Reports**, v. 6, 19 abr. 2016.

SANTOS, M. DE O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SCANU, A. M.; DE MIGLIO, M. R. Therapeutic Landscapes in Colorectal Carcinoma. **Medicina (Lithuania)**, v. 59, n. 5, 1 maio 2023.

SEDLAK, J. C.; YILMAZ, O. H.; ROPER, J. Metabolism and Colorectal Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, p. 467–492, 24 jan. 2023.

SEETHARAM, R. N.; SOOD, A.; GOEL, S. Oxaliplatin: Preclinical perspectives on the mechanisms of action, response and resistance. **ecancermedicalsecience**, v. 3, n. 1, 24 set. 2009.

SHAHEEN, S. *et al.* Differential expression and pathway analysis in drug-resistant triple-negative breast cancer cell lines using RNASeq analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 19 jun. 2018.

SHAIKH, S. *et al.* Curcumin: Reclaiming the lost ground against cancer resistance. **Cancer Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 298–320, 2021.

SHAKIBAEI, M. *et al.* Curcumin Enhances the Effect of Chemotherapy against Colorectal Cancer Cells by Inhibition of NF- κ B and Src Protein Kinase Signaling Pathways. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 22 fev. 2013.

SHE, T. *et al.* Combination of long-acting TRAIL and tumor cell-targeted photodynamic therapy as a novel strategy to overcome chemotherapeutic multidrug resistance and TRAIL resistance of colorectal cancer. **Theranostics**, v. 11, n. 9, p. 4281–4297, 2021.

SIMELANE, N. W. N.; ABRAHAMSE, H. **Nanoparticle-mediated delivery systems in photodynamic therapy of colorectal cancer. International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 nov. 2021.

SOROKIN, M. *et al.* Personalized targeted therapy prescription in colorectal cancer using algorithmic analysis of RNA sequencing data. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.

SPRING, B. Q. *et al.* The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1476–1491, 1 ago. 2015.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. Appendix 3, 2001.

SU, C. *et al.* The effect and mechanism of erianin on the reversal of oxaliplatin resistance in human colon cancer cells. **Cell Biology International**, v. 45, n. 12, p. 2420–2428, 1 dez. 2021.

- SUN, B.; LI, W.; LIU, N. Curative effect of the recent photofrin photodynamic adjuvant treatment on young patients with advanced colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 11, n. 3, p. 2071–2074, 1 mar. 2016.
- SZAKÁCS, G. *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, mar. 2006.
- TAN, L. *et al.* GRHL3 Promotes Tumor Growth and Metastasis via the MEK Pathway in Colorectal Cancer. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2021, 2021.
- TORRES, O. J. M. *et al.* **Brazilian Consensus for Multimodal Treatment of Colorectal Liver Metastases. Module 3: Controversies and Unresectable Metastases.** Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery. **Anais...** 1 jul. 2016.
- URH, K.; ZIDAR, N.; BOŠTJANČIČ, E. Bioinformatics Analysis of RNA-seq Data Reveals Genes Related to Cancer Stem Cells in Colorectal Cancerogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, 1 nov. 2022.
- VAN DER JEUGHT, K. *et al.* Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 34, p. 3834–3848, 14 set. 2018.
- VAUGHAN-SHAW, P. G. *et al.* The effect of vitamin D supplementation on survival in patients with colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **British Journal of Cancer**, v. 123, n. 11, p. 1705–1712, 24 nov. 2020.
- VILSINSKI, B. H. *et al.* Spectroscopic study of aluminum phthalocyanine chloride (AlPcCl) in homogeneous and micro-heterogeneous media consisting of P-123 AND F-127 polymeric micelles. **Quimica Nova**, v. 38, n. 5, p. 631–639, 1 jun. 2015.
- WANG, B. *et al.* FOXA2 promotes the proliferation, migration and invasion, and epithelial mesenchymal transition in colon cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 1, p. 133–140, 1 jul. 2018.
- WANG, J. *et al.* Curcumin induces apoptosis in p53-null Hep3B cells through a TAp73/DNp73-dependent pathway. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 4203–4212, 1 mar. 2016.
- WANG, L. *et al.* Targeting DCLK1 overcomes 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer through inhibiting CCAR1/ β -catenin pathway-mediated cancer stemness. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, n. 5, maio 2022.
- WANG, X. KANG *et al.* Knockdown of GRHL3 inhibits activities and induces cell cycle arrest and apoptosis of human colorectal cancer cells. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 37, n. 6, p. 880–885, 1 dez. 2017.

WAS, H. *et al.* Bafilomycin A1 triggers proliferative potential of senescent cancer cells in vitro and in NOD/SCID mice. **Oncotarget**, v. 8, n. 6, p. 9303–9322, 2017.

WAS, H. *et al.* Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features. **Cancer Biology and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 63–75, 2 jan. 2018.

WILSON, R. H. *et al.* Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 7, p. 1767–1774, 1 abr. 2002.

WONG, K. E. *et al.* Curcumin nanoformulations for colorectal cancer: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

WU, Y. *et al.* Upregulation of kallikrein-related peptidase 5 is associated with the malignant behavior of colorectal cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 3, p. 2164–2170, 1 set. 2016.

WU, Z. X. *et al.* Establishment and Characterization of an Irinotecan-Resistant Human Colon Cancer Cell Line. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 22 fev. 2021.

XIE, Z. *et al.* Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. **Current Protocols**, v. 1, n. 3, 1 mar. 2021.

XU, L. *et al.* Increased expression of Solute carrier family 12 member 5 via gene amplification contributes to tumour progression and metastasis and associates with poor survival in colorectal cancer. **Gut**, v. 65, n. 4, p. 635–646, 1 abr. 2016.

XUE, X. *et al.* Quantitative proteomics identifies STEAP4 as a critical regulator of mitochondrial dysfunction linking inflammation and colon cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 114, n. 45, p. E9608–E9617, 7 nov. 2017.

YANG, C. *et al.* PEG-liposomal oxaliplatin potentialization of antitumor efficiency in a nude mouse tumor-xenograft model of colorectal carcinoma. **Oncology Reports**, v. 25, n. 6, p. 1621–1628, jun. 2011.

YANO, S. *et al.* Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. **Cell Cycle**, v. 13, n. 6, p. 953–960, 15 mar. 2014.

YILMAZ, Ç. *et al.* Diclofenac down-regulates COX-2 induced expression of CD44 and ICAM-1 in human HT29 colorectal cancer cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 11, p. 2259–2272, 1 nov. 2021.

YIN, J. *et al.* Curcumin reverses oxaliplatin resistance in human colorectal cancer via regulation of TGF- β /Smad2/3 signaling pathway. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 3893–3903, 2019.

YU, C. *et al.* Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing. **Cell Research**, v. 24, n. 6, p. 701–712, 2014.

YU, I. S.; CHEUNG, W. Y. Metastatic colorectal cancer in the era of personalized medicine: A more tailored approach to systemic therapy. **Can J Gastroenterol Hepatol**, v. 2018, n. 9450754, 2018.

YU, Y. *et al.* Elimination of colon cancer stem-like cells by the combination of curcumin and FOLFOX. **Translational Oncology**, v. 2, n. 4, p. 321–328, 2009.

ZARGHAMPOOR, F.; VALIBEIGI, B.; BEHZAD-BEHBAHANI, A. The molecular characteristics of colorectal cancer: Impact of Ibuprofen and hyperthermia. **Molecular Biology Research Communications**, v. 12, n. 1, p. 17–25, 2023.

ZENG, C. *et al.* DPEP1 promotes drug resistance in colon cancer cells by forming a positive feedback loop with ASCL2. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 1, p. 412–424, 1 jan. 2023a.

ZENG, X. *et al.* Forkhead box A2 Promotes Colorectal Cancer Progression and Targets BCL2-Associated X (BAX) Protein. **Iran J Public Health**, v. 52, n. 2, p. 306–314, 2023b.

ZHANG, B. *et al.* Development and evaluation of oxaliplatin and irinotecan co-loaded liposomes for enhanced colorectal cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 10–21, 28 set. 2016.

ZHANG, N.; FU, J.-N.; CHOU, T.-CHAO. Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludelon with cytoprotective panaxytriol derived from panax ginseng against MX-1 cells in vitro: experimental design and data analysis using the combination index metho. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 97–104, 2016.

ZHANG, P. *et al.* Curcumin synergizes with 5-fluorouracil by impairing AMPK/ULK1-dependent autophagy, AKT activity and enhancing apoptosis in colon cancer cells with tumor growth inhibition in xenograft mice. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, 22 dez. 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Knockdown of KLK11 reverses oxaliplatin resistance by inhibiting proliferation and activating apoptosis via suppressing the PI3K/AKT signal pathway in colorectal cancer cell. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 809–821, 16 fev. 2018.

ZHENG, Y.; ZHOU, J.; TONG, Y. Gene signatures of drug resistance predict patient survival in colorectal cancer. **Pharmacogenomics Journal**, v. 15, n. 2, p. 135–143, 25 abr. 2015.

ZHU, G. X. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling: Causes and treatment targets of drug resistance in colorectal cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 23, n. 2, 1 fev. 2021.

ZHU, H. *et al.* Identification of key pathways and genes in colorectal cancer to predict the prognosis based on mRNA interaction network. **Oncology Letters**, v. 18, n. 4, p. 3778–3786, 2019.

ZHU, Y. F.; DONG, M. Expression of TUSC3 and its prognostic significance in colorectal cancer. **Pathology Research and Practice**, v. 214, n. 9, p. 1497–1503, 1 set. 2018.

ZHU, Y.; LI, X. Advances of Wnt Signalling Pathway in Colorectal Cancer. **Cells**, v. 12, n. 3, p. 447, 1 fev. 2023.

ANEXO I – Artigo publicado com o título “Establishment and characterization of oxaliplatin-resistant human colorectal cancer cell line”



IOSR Journals
International Organization
of Scientific Research

Australia | Qatar | India | New York | Malaysia

Certificate

| | | | |
|---------------|-------|----------|------------|
| Office Code : | M1867 | Date : | 2023-04-27 |
| MIC No. : | 2854 | Status : | Published |

Article Details

This is to certify that following paper has been published in IOSR Journals.

| | | |
|------------------|---|---|
| Article Title | : | Establishment and characterization of oxaliplatin resistant human colorectal cancer cell line |
| Author's Name | : | Amanda A. C. Morais , Karina Neres, Ygor F. Nogueira, Renato K. A. de O. Franca , Rayane Ganassin , Patricia B. da Silva , Andrea Q. Maranhao , Ricardo B. de Azevedo |
| Journal Name | : | IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences |
| ISSN | : | 2278-3008 |
| Publisher Name | : | International Organization of Scientific Research |
| Journal Url | : | www.iosrjournals.org |
| Publishing Model | : | Open Access Publishing |
| Review Type | : | Blind Peer Review Process |
| Journal Type | : | Indexed Refereed Journal |
| Volume No. | : | 18 |
| Issue No. | : | 02 |
| Article DOI | : | 10.9790/ 3008-1802024757 |



Signature
Editorial Manager
IOSR Journals
support@iosrmail.org